

# **Kiskunsági szikes tavak és talajok baktériumközösségeinek diverzitása és só-tűrőképessége**

*Környezettudományi TDK dolgozat*

készítette:

**Bárány Ágnes**

Biológus MSc, 2. évfolyam

témavezető:

**Dr. Borsodi Andrea, docens**  
Mikrobiológiai Tanszék

**EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNYEGYETEM  
TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR  
BIOLÓGIAI INTÉZET**



Budapest, 2014

## Tartalom

1. Bevezetés.....	1
2. Irodalmi áttekintés.....	2
2.1. A hazai szikes vizes élőhelyek kialakulása, sajátosságai.....	2
2.2. A hazai szikes vizes élőhelyek jellegzetes vegetáció típusai.....	5
2.3. A hazai szikes tavak bakteriológiai diverzitása.....	5
2.4. A halofil baktériumok csoportosítása.....	7
3. Célkitűzések.....	8
4. Anyagok és módszerek.....	9
4.1. Mintavételezés.....	9
4.2. Közösségi DNS izoláláson alapuló Denaturáló Gradiens Gélelektroforézis (DGGE) vizsgálat.....	10
4.3. Tenyésztésen alapuló vizsgálatok.....	12
4.3.1. Baktériumtörzsek izolálása és csíraszám becslés.....	12
4.3.2. A baktériumtörzsek sótolerancia vizsgálata.....	12
4.3.3. A baktériumtörzsek genotípusos jellemzése.....	12
5. Eredmények és megvitatásuk.....	15
5.1. Szikes baktériumközösségek szerkezetének vizsgálata DGGE segítségével.....	15
5.2. Csíraszámbecslés, az izolált baktériumtörzsek növekedésének vizsgálata.....	19
5.3. A baktériumtörzsek sótoleranciója.....	20
5.4. A tenyésztéses vizsgálatokkal azonosított baktériumtörzsek.....	25
6. Összefoglalás.....	30
7..... Irodalomjegyzék.....	31
8..... Köszönetnyilvánítás.....	36

## 1. Bevezetés

A világ minden kontinensén előfordulnak sós, szikes tavak. Hazánkban a két legnagyobb szikes tó, a Fertő-tó és a Velencei-tó mellett a szikes vizek túlnyomó része az Alföldön helyezkedik el. Kiemelt jelentőségűek a Kiskunsági Nemzeti Park területén található sekély vizű, időszakos vízborítottságú, erősen lúgos kémhatású szikes tavak, melyek sókoncentrációja igen tág határok között változik. E vizes élőhelyeket hazai és nemzetközi természetvédelmi törvények védik, mivel fontos pihenő- és élőhelye számos lúd-, réce- és partimadár fajnak. A szikes tavak környezetében sótűrő növények élnek, melyek elhelyezkedése a vízparttól távolodva jellegzetes zonációt mutat.

A szikes tavak és talajok mentén létrejövő különleges környezeti körülményekhez változatos módon alkalmazkodtak az itt élő baktériumok. Az extrém élőhelyeken élő baktériumok kutatása az utóbbi években sok figyelmet kapott, mivel az általuk termelt különböző ozmotikumokat és enzimeket számos helyen hasznosítják ipari és biotechnológiai folyamatok során.

A Kiskunsági Nemzeti Park területén található fokozottan védett Böddi-szék, Kelemen-szék és Zab-szék vizében és mederüledékében élő baktériumközösségeket már korábban is vizsgálták. Jelenlegi vizsgálataink során a tavak vizéből, mederüledékéből és néhány vízpartot övező, jellegzetes szikes talajokon élő növény rizoszférájából gyűjtöttünk mintákat. Munkánk során az egyes mintavételi helyszíneken jelenlévő baktériumközösségek azonosítását, valamint a különböző zónákban élő baktériumok sótoleranciájának vizsgálatát tűztük ki célul.

## 2. Irodalmi áttekintés

### 2.1. *A hazai szikes vizes élőhelyek kialakulása, sajátosságai*

A Föld valamennyi kontinensén fellelhetők sós, szikes tavak, melyek becsült víztérfogata megközelíti az édesvizekét ( $104.000 \text{ km}^3$  -  $125.000 \text{ km}^3$ ) (BOROS E. 1999). Nagy sótartalmuk miatt szalin vagy hiperszalin környezeteknek is nevezzük őket (OREN, A. 2008).

A sós állóvizeken belül vízkémiai tulajdonságaik alapján jól elkülöníthetők a szikes vizek. A Kárpát-medence két legnagyobb sekélytő típusú szikes állóvize a Fertő és a Velencei-tó. Az időszakos vízborítottságú, sekély vizű szikes élőhelyek túlnyomó többsége az Alföldön található. Bár a köznapi szóhasználatban szikes tavaknak nevezzük őket, limnológiai értelemben nem igazi tavak, ugyanis a vízmélység és a környezeti jellemzők alapján nem különíthető el a parti öv és a nyílt vízi tájék (BOROS E. 2002).

A szikes tavakat különböző éghajlati, közettani és vízföldtani adottságok formálták. A Kárpát-medence alföldi területeinek szikesedésében jelentős szerepet játszik a megfelelő mennyiségű, minőségű só-utánpótlás, melynek forrása a medencét övező vulkanikus és mészkőhegységekből származó mállástermék, valamint a löszben és a futóhomokban felhalmozódott nátrium-, kalcium- és magnéziumtartalom. Emellett fontos a medence lefolyástalan jellege (BOROS E. 2002).

A lefolyástalan medencék kialakulásában szerepet játszhat a vulkáni működés (pl. a törökországi Van-tó, a kaliforniai Mono Lake esetében), a tektonikus mozgás (pl. a Kelet-afrikai árokrendszer nagy tavai, az egyiptomi nátron tavak izolációja a Nílustól), valamint a szél és a folyók medencealakító tevékenysége (pl. a kiskunsági szikes tavak esetében) (GRANT, W. D. 1992).

A Kiskunsági Nemzeti Park (KNP) területén található vízzáró rétegek évezredek alatt felhalmozódott, finom szemcséjű, tömör folyami üledékből alakultak ki. Az éghajlat kontinentális jellegű, a nedves téli és tavaszi időszakot meleg és száraz nyár követi, melyek szélsőséges váltakozásai során vízfeltöltődés és rendszeres felszíni kiszáradás megy végbe. A szikes tavak vízjárása során a csapadékosabb tavaszokon a talajvíz nyomása olyan nagy is lehet, hogy a tómeder közelében ásott kutakban a vízszint eléri a kútkáva tetejét, sőt, megfigyeltek már talajvízkitörést is ilyen kutakban. Nyáron, száraz, aszályos időben a talajvíz szintje jelentősen süllyed, a víz végül a legmélyebb fekvésű, a felszínen lefolyástalan medrekben gyűlik össze. A nagy kiterjedésű, felszín alatti vízgyűjtő területről odaszállított

sók a lecsökkent víztérfogatban koncentrálnak. A fokozott párolgás szívóhatása következtében a mélyebb rétegekből is megindul a sós talajvizek feláramlása. A legaszályosabb időszakban a medrek teljesen kiszáradnak, a felszínen koncentráldott oldott sók kristályok formájában csapódnak ki. Ezzel szemben télen csaknem teljesen befagynak ezek a sekély tavak. E nagy szezonális vízszint ingadozások miatt halak tartósan nem élnek meg itt (BOROS E. 2007).

A szikes tómedreket övező, kissé magasabb térszinteken ritkán jelenik meg összefüggő vízborítás, azonban a nagy sótartalmú talajvíz itt is a felszín közelében van, így a környező területeken szikes talajok alakulnak ki. Hazánkban a Duna mentén az alpesi eredetű, kalciumban gazdag üledéken a jellegzetes, meszes-szódás szoloncsák talajok, míg a mészben szegényebb, kárpáti vulkanikus eredetű üledékekkel fedett Tiszavölgyben többnyire a szolonyec és szology típusú szikes talajok alakultak ki. A talajtani osztályozás szerint a szikesek talaja hidromorf típusú, vagyis az éghajlat hatásait elnyomja a vízhatás, valamint az erős párolgás következtében a talajvíz sódinamikája a legfontosabb talajformáló tényező. A szikes talajok ezért általában ott alakulnak ki, ahol a vízben jól oldódó sók, főként nátriumsók jelentős szerepet játszanak (BOROS E. 2002).

A Kárpát-medence szikes tavainak egyik legfontosabb vízkémiai sajátossága a világ más szikes tavaihoz képest az alacsonyabb sótartalom ( $0,5-7,5 \text{ g l}^{-1}$ ) és az erős lúgosság (BOROS E. 1999). A szikes tavak vizében  $\text{Na}^+$  ion mellett az anionok közül a hidrogén-karbonát-ion ( $\text{HCO}_3^-$ ) van túlsúlyban. A Dunavölgyi-síkság tavai esetében, különösen a Böddi-székben a hidrogén-karbonát mellett a klorid ( $\text{Cl}^-$ ) mennyisége is jelentős. A karbonát ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) és szulfát ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) aránya kissé változó, de hozzávetőlegesen minden tóban hasonló. PONYI és mtsai (1957) megállapították, hogy a szikes vizek kémiai egyensúlyát a disszociált állapotú  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{NaHCO}_3$  és  $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$ , valamint az oldatlan  $\text{CaCO}_3$  tartja fenn, melynek során az egyensúlyi folyamatokat a víz szabad szén-dioxid-tartalma befolyásolja. A tavak vizének szalinitását az ásványianyag-tartalom alapján határozhatjuk meg. WILLIAMS (1967) átmeneti (szubszalinikus) kategóriába sorolja a  $500-3000 \text{ mg L}^{-1}$  szalinitási tartományba eső vizeket, és  $3000 \text{ mg L}^{-1}$  sótartalom felett beszél sós vizekről. HAMMER (1986) a kontinentális sós vizeket a  $3000$ -tól  $20000 \text{ mg L}^{-1}$ -ig terjedő szalinitási tartományban hiposzalinikus kategóriába sorolja. A nemzetközi terminológia szerint a Kárpát-medencében található szikes tavak a szub- és hiposzalinikus vizek közé tartoznak. FELFÖLDY (1987) a kontinentális sós vizek szalinitásának alsó határát  $600 \text{ mg L}^{-1}$  értéknél határozta meg. A természet védelméről szóló 1996. évi LIII. törvény a szikes tavakra vonatkozó ex lege védeettséget ehhez a határértékhez, mint minimális kritériumhoz köti (BOROS E. 2007). 2004-ben BOROS és mtsai

átfogó vizsgálatot végeztek többek között a KNP területén található szikes tavak trofikus kapcsolatainak feltárására. 2004. február és október között minden hónapban megmérték a szikes tavak vizének pH-ját és szalinitását. A szalinitás és a fajlagos vezetőképesség közötti általános összefüggést az alábbi képlettel írták le:

$$\text{Szalinitás} = C \times \text{EC}$$

ahol a szalinitás értéke ( $\text{g L}^{-1}$ ) jól közelít a vízben található ionok mennyiségének összegéhez, a C a tavak ionösszetételétől függő állandó, EC pedig a fajlagos elektromos vezetőképesség ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ )  $25^\circ\text{C}$ -ra kalibrálva (BOROS E. 2007). A BOROS és mtsai (2004) által kapott és a jelenlegi vizsgálataink során kapott mérési eredményeket az 1. táblázat foglalja össze.

**1. táblázat. A KNP területén található szikes tavak vízkémiai tulajdonságai 2004-ben és a mintavétel időpontjában**

	2004				2013. szeptember		
	pH (átlag)	szalinitás ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )			pH	fajl. elektromos vezetőképesség ( $\text{mS} \cdot \text{cm}^{-1}$ )	szalinitás ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )
		min.	max.	átlag			
<b>Böddi-szék</b>	9,28	1,77	13,18	6,36	9,81	33	7,71
<b>Kelemen-szék</b>	9,16	1,09	6,36	3,40	9,93	16	7,59
<b>Zab-szék</b>	9,14	1,24	5,31	2,54	9,71	12	9,67

A geológiai, hidrológiai, botanikai, zoológiai tekintetben egyedülálló szikes tavakat 1997. január. 1-től védett területnek nyilvánították a 1996. évi LIII. törvény 23. § (2) alapján. Ezen kívül nemzetközi egyezmények által védett szikes tavak is vannak Magyarországon, például a Ramsari Egyezményben 21 magyarországi terület szerepel, ezek közül hat nagyrészt szikes tavakat és pusztákat foglal magába. Az emberi tevékenységnek köszönhetően a XX. században jelentősen csökkent a szárazföldi vizes élőhelyek száma, kiterjedése. A reformkorban zajló nagy folyamszabályozások, a vizes területek lecsapolása, a globális felmelegedés és az ezzel járó klimatikus vízhiány, a szikes tavakat övező mezőgazdasági területekről származó műtrágya beszivárgása és az ezzel járó elmocsarasodás és eutrofizáció mind-mind a szikes élőhelyek megváltozását idézi elő. E zavaró hatások következtében a vizes élőhelyek természetes élővilága megváltozik, egyes fajok száma megritkul, ugyanakkor tájidegen fajok el tudnak szaporodni (BOROS E. 2002).

## 2.2. A hazai szikes vizes élőhelyek jellegzetes vegetáció típusai

A vizsgált szikes tavak környékének makrovegetációja az erőteljes szódás jellegnek megfelelően zonációt mutat. A szikes víztér sekélyebb parti övezetében található a szikes mocsári vegetáció, ahol a homogén zsiókás (*Bolboschoenus maritmus*) és a szikinádas (*Bolboschoeno-Phragmitetum*) mozaikos társulásokat alkot. Átlagos viszonyok között a mocsári növényzet és a nyílt meder tartós vízborítottság alatt áll (BOROS E. 2007). A víztértől távolodva szikfok, vakszik, szikpadka és szikes puszták zonációkat különíthetünk el. A vakszik zónájától mélyebbre eső, hosszabb ideig vízborítottság alatt álló területeken alakul ki a szikfok növényzete, melyek jellegzetes növényei a sziki mészpázsit (*Puccinellia limosa*) és a pozsgás zsázsa (*Lepidion crassifolium*). Ezek mellett gyakran megjelenhet a szikes rétekre jellemző mocsári csetkák (*Eleocharis palustris*) és sziki szittyó (*Juncus gerardi*) is. A szikpadka és a vakszik közötti időszakos vízborítottságú területeken nedves sziki rétek alakulnak ki. Itt többek között fehér tippán (*Agrostis stolonifera*), a kötőkák (*Schoenoplectus tabernaemontani*) vagy a sziki szittyó (*Juncus gerardii*) alkot társulást a kisvirágú pozdorr (*Scorzonea parviflora*), de társulás alkotók az egyes sásfajok (*Carex* sp.) is. A nedves sziki réteknél bővebb vízellátottságú területeken sziki mocsárrét alakul ki, melynek a szikesedés mértékétől függően több típusát különíthetjük el. Jellegzetes növényei például a réti harmatkása (*Glyceria fluitans*), a korcs nőszirm (*Iris spuria*) és a sziki boglárka (*Ranunculus lateriflorus*), valamint különböző őszirózsa fajok (*Aster* sp.). Időszakosan nedves szikes pusztákon rövid fűvű, sziki fajokban gazdag társulások figyelhetők meg, melynek jellegzetes fajai a sziki pozdor (*Podospermum canum*) a sziki varjúháj (*Sedum caespitosum*), a villás boglárka (*Ranunculus spedatus*) és az érdes csüdfű (*Astragalus asper*) fajok (BOROS E. 2002).

## 2.3. A hazai szikes tavak bakteriológiai diverzitása

A szikes tavak nagy produktivitásában szerepet játszik karbonátokban rendkívül gazdag vizük, a magas hőmérséklet és az intenzív napsugárzás. Az erősen lúgos és/vagy sós vizek jellegzetes fotoszintetizáló szervezetei a cianobaktériumok mellett az anoxikus fototróf baktériumok (pl. *Ectothiorhodospira*, *Halorhodospira*) is (JONES, B.E. et al. 1998, GRANT, S. et al. 1999).

A hatalmas mértékű primer produkcióra a kemoorganotróf baktériumok változatos közössége épül, az üledékekben általában a  $10^5$ - $10^6$  TKE g<sup>-1</sup> csíraszám a jellemző. A Gram-

pozitív baktériumok közül a *Bacillus* genusz képviselői tipikusak, de jelentős arányban fordulnak elő az Actinobacteria törzs képviselői is, melyek közül a legelterjedtebbek a *Streptomyces* nemzetség tagjai. A Gram-negatív baktériumok többségében a Gammaproteobacteria osztály tagjai közül kerülnek ki, főként a *Halomonas*, *Pseudomonas*, *Aeromonas* és *Alteromonas* genuszok képviselői jellegzetesek (DUCKWORTH, A. W. et al. 1996). Az utóbbi években a szibériai és az afrikai szódatavakból különböző aerob kénoxidáló baktériumokat (pl. *Thiocalcalimicrobium*, *Thioalcalivibrio*), a közép-ázsiai és a délkelet-transzbajkái szóda tavakból alkalofil metánoxidáló baktériumokat (pl. *Methylobacter alcaliphilus*), továbbá a kelet-mongóliai szikes tavakból metilotróf baktériumokat (pl. *Methylophaga alcalica*) izoláltak. Az Alphaproteobacteria osztály tagjai közül a litotróf nitritoxidáló *Nitrobacter alcalicus* faj képviselőit Szibéria és Kenya szikes tavaiból tenyésztették ki, ahol fontos szerepet tölt be a N<sub>2</sub>-körforgalomban (KHEMELENINA, N. V. et al. 1997, SOROKIN, D. Y. et al. 2000, 2003).

A Kárpát-medencében található szikes tavak vizében is meghatározó szerepet játszanak a fotoautotróf pikoplankton közösségek. Faji összetételük, mennyiségük jellegzetes, évszakoknak megfelelő dinamikát mutat. Nyáron a pikocianobaktériumok, ősztől tavaszig az eukarióta algák domináns előfordulása figyelhető meg. A pikocianobaktériumok nagy részét (74-100%-ban) vörösen fluoreszkáló, kokkoid, 1 µm átmérőjű sejtek alkotják, mennyiségük olykor a nemzetközi irodalomban leírt legmagasabb értékeket is meghaladja. Kis méretük miatt taxonómiai azonosításuk tenyésztéses vizsgálatokkal nem, csak molekuláris biológiai technikákkal végezhető el. A KNP területén található székek pikocianobaktérium közösségének feltárása során FELFÖLDI és mtsai (2008) molekuláris biológiai technikák segítségével *Anabaenopsis*, *Synechococcus*, *Cyanobium*, valamint *Skeletonema* genuszok képviselőinek jelenlétét mutatta ki. Emellett a vizsgálatok során számos, korábban nem azonosított fotoszintetizáló prokarióta jelenlétét is detektálták (FELFÖLDI T. et al. 2008).

A magyarországi szikes jellegű tavak többségét vizsgálták már bakteriológiai szempontból. A Fertő-tó baktériumközösségeinek részletes, tenyésztésen alapuló vizsgálatát BORSODI és mtsai (1990) végezték. A tó vizéből és a nád biofilm bevonatából izolált törzsek között sok halotoleráns szervezetet sikerült kimutatniuk, melyek a *Bacillus*, a *Micrococcus*, a *Pseudomonas*, a *Flavobacterium*, az *Aeromonas* és az *Arthrobacter* nemzetségekbe tartoztak.

A Velencei-tó üledékéből izolált baktériumtörzsek nagy része a *Bacillus* genuszba tartozott, valamint sor került néhány új, ezidáig ismeretlen taxon leírására is (BORSODI A. et al. 2001). A Velencei-tó nád biofilm baktériumközösségeit RUSZNYÁK és munkatársai (2003)



vizsgálták, melynek során a *Bacillus* nemzetség mellett, a *Pseudomonas*, az *Aureobacterium*, az *Agrobacterium* és az *Aeromonas* nemzetség képviselőit azonosították.

A Kiskunság szikes tavainak tenyésztésen alapuló bakteriológiai vizsgálata során főként a *Bacillus* nemzetségbe tartozó törzsek mellett a *Halomonas*, a *Pseudomonas*, a *Nesterenkonia*, a *Micrococcus* és az *Agromyces*genuszok jelenlétét mutatták ki (SZABÓ G. et al. 2004).

#### 2.4. A halofil baktériumok csoportosítása

A halofil baktériumok csoportosítására vonatkozóan több definíció is született, ám a legszélesebb körben elfogadott KUSHNER nevéhez fűződik (1978). Eszerint azok a mikroorganizmusok tekinthetők halofilnek, melyek növekedési optimuma 0,5 és 2,5 M sókoncentráció között van. Azokat a baktériumokat, melyek egyaránt képesek növekedni relatíve magas (8%-os) sótartalom mellett és sóhiány esetén is, halotoleránsoknak nevezzük (VENTOSA, A.. et al. 1998). A nagy sókoncentráción élő mikroorganizmusok osztályozása több szempont szerint is lehetséges, azonban mindig vannak olyan mikroorganizmusok, melyek nem sorolhatók be egyértelműen a többi, már definiált csoportba (OREN, A. 2008). KUSHNER rendszere a sótartalomtól való függésen és a sótolerancián alapul, melyet a 2. táblázat foglal össze.

2. táblázat. A halofil baktériumok csoportosítása KUSHNER szerint  
(OREN, A. 2008 nyomán)

Kategória	Növekedési optimum		Példák
	koncentráció	w/v	
nem halofil	< 0,2 M NaCl	< 1,168%	legtöbb édesvízi baktérium
enyhén halofil	0,2-0,5 M NaCl	1,168% - 2,922%	legtöbb tengeri baktérium
mérsékelt halofil	0,5-2,5 M NaCl	2,922% - 14,6%	<i>Salinivibrio costicola</i>
átmenet a mérsékelt és az extrém halofil között	1,5-4,0 M NaCl	8,766% - 23,376%	<i>Halorhodospira halophila</i>
extrém halofil	2,5-5,2 M NaCl	14,6% - 30,38%	<i>Halobacterium salinarum</i>
halotoleráns	Nem halofil baktériumok, de képesek tolerálni a só jelenlétét. Ha 2,5 M (14,6%) NaCl felett is mutatnak növekedést, extrém halotoleránsoknak nevezzük.		<i>Staphylococcus aureus</i>

Az egyes fajok esetében a sóigény és a sótolerancia mértéke tág határok között változik, mely nagymértékben függ a hőmérséklettől. Általánosságban elmondható, hogy a mikroorganizmusok magasabb hőmérsékleten több sót igényelnek.

### **3. Célkitűzések**

Jelen vizsgálataink során a Kiskunsági Nemzeti Parkterületén található szikes kistavak vizéből, mederüledékéből és a székektől különböző távolságban élő, néhány jellegzetes sziki növény rizoszférájából vettünk mintát abból a célból, hogy elemezzük és összehasonlítsuk a sótartalom hatását a különböző zónákban élő baktériumokra. A nagy sótartalomhoz alkalmazkodott baktériumközösségek vizsgálatához a nyárvégi időszakban gyűjtöttünk mintákat, amikor a szikes kistavakat alacsony vízállás és nagy sókoncentráció jellemezte. Az egyes mintákra jellemző baktériumközösségek szerkezetének összehasonlítása céljából egy tenyésztéstől független, molekuláris biológiai módszert alkalmaztunk. Különböző szelektív táptalajok felhasználásával mindegyik mintából izolátumokat hoztunk létre, hogy megvizsgáljuk és értékeljük a tenyésztésbe vont törzsek sótoleranciáját. Az általunk kitenyésztett baktériumtörzsek azonosítása révén célunk volt az egyes mintavételi helyekre jellemző tenyésztethető faji sokféleség feltárása is.

## 4. Anyagok és módszerek

### 4.1. Mintavételezés

Víz, üledék és talajmintákat 2013. 09. 16-án vettünk a Böddi-szék, a Kelemen-szék és a Zab-szék területéről (3. táblázat, 1., 2., 3. kép). A vízmintákat a szikes kistavak közepéről merítéssel gyűjtöttük, az üledék- és talajmintákat steril vegyszeres kanalak segítségével vettük előzetesen sterilizált üvegedényekbe. A mintákat a 24 órán belül elvégzett feldolgozásig 6-8°C-os hőmérsékleten tároltuk.

3. táblázat. A KNP területén található székek vizéből, üledékéből és a vízpartot övező növények rizoszférájából gyűjtött minták jelzése

	Víz- minta	Üledék- minta	Rizoszféra talajminta				
			zsióka	sziki mészpázsit	rókasás	őszirózsa	érdes csúdfű
<b>Böddi-szék</b>	BV	B15	B16	B17			
<b>Kelemen-szék</b>	KV	K18	K19		K20	K21	
<b>Zab-szék</b>	ZV	Z22	Z23			Z24	Z25



1. kép. – A Böddi-szék a mintavétel időpontjában



**2. kép. – A Kelemen-szék a mintavétel időpontjában**



**3. kép. – A Zab-szék a mintavétel időpontjában**

#### ***4.2. Közösségi DNS izoláláson alapuló Denaturáló Gradiens Gélelektroforézis (DGGE) vizsgálat***

Minden egyes víz-, üledék- és talajmintákból a Mo Bio PowerSoil DNA Isolation Kit (Mo Bio Laboratories, Inc.) segítségével a gyártó utasításainak megfelelően izoláltunk közösségi DNS-t. A 16S rRNS génszakaszt PCR (Polimerase Chain Reaction) segítségével 27 forward (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') és 1401 reverse (5'-GGG TGT GTA CAA GAC CC-3') primerekkel (Applied Biosystems Gene Amp PCR System 2700 készülék)

szaporítottuk fel. Reakciónként 1-1 mintára 0,2 ml-es PCR csövekbe 49,5 µl premix oldatot és 0,7 µl DNS templátot mértünk össze a következő recept alapján:

*A PCR premix összetétele (mintánként):*

10x PCR puffer	5 µl
dNTP	10 µl
dH <sub>2</sub> O	32,8 µl
Forward primer	0,5 µl
Reverz primer	0,5 µl
Taq polimeráz	0,2 µl
DNS templát	1 µl
Össztérfogat	50 µl

*A PCR hőprofilja:*

kezdeti denaturáció	95°C	3 min	
denaturáció	94°C	30 sec	} 32ciklus
anneláció	52°C	30 sec	
extenzió	72°C	1 min	
végső extenzió	72°C	10 min	
hűtés	4°C	∞	

A felszaporított DNS-t DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) módszerrel vizsgáltuk (KNÁB M. et al.2012), melyhez a szükséges GC-kapoccsal rendelkező PCR termékeket nested PCR reakciókban állítottunk elő 27 forward és 519 reverse (5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3') GC-kapcsos primerek felhasználásával (BORSODI A. et al. 2011). A PCR termékeket 8%-os poliakrilamid gélre vittük fel, mely denaturáló urea és formamid 40-60%-os gradiensét tartalmazta. A gélelektroforézist 14 órán keresztül, 60°C-on 120 V feszültségen végeztük. A gélét etidium bromiddal festettük meg, majd a DNS csíkokat UV fényben detektáltuk. A gélképet Total Lab TL szoftver segítségével értékeltük ki (KNÁB M. et al. 2012).

Az egyes gélcsávokból az erősebben festődött, különálló csíkokat kivágtuk. Mintánként egy-egy 600 µl-es Eppendorf-csőbe 30 µl desztillált vizet mértünk, majd mindegyikbe egy kivágott gélcsíkot helyeztünk. Egy éjszaka alatt a gélből a DNS a desztillált vízbe diffundált, amit PCR reakció segítségével felszaporítottuk a fentebb megadott hőprofil mellett.

A PCR termékek bázissorrendjét az LGC Genomics (Berlin, Németország) szolgáltatásának igénybevételével határoztuk meg. A kapott szekvenciákat az EzTaxon program (KIM, O. S. et al., 2012). segítségével azonosítottuk. Az azonosított filotípusok és a velük legközelebbi rokonságban álló baktériumfajok szekvenciáinak felhasználásával neighbor-joining módszerrel és Kimura-2 korrekcióval filogenetikai dendrogramot készítettünk.

### **4.3. Tenyésztésen alapuló vizsgálatok**

#### *4.3.1. Baktériumtörzsek izolálása és csíraszám becslés*

Minden egyes víz-, üledék- és talajmintából hattagú tízes léptékű hígítási sorozatot készítettünk. A hígítási sorozatok egyes tagjait módosított glükózos (DSM-940, [www.dsmz.de](http://www.dsmz.de)) és R2A (DSM-830, [www.dsmz.de](http://www.dsmz.de)) táptalajokra szélesztettük. Mindkét táptalaj esetében 5 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -t adtunk 1000 ml térfogathoz, és pH 9,0 értékre állítottuk be. A szélesztéssel fertőzött táptalajokat 1 hétig, szobahőmérsékleten inkubáltuk, majd csíraszám becslést végeztünk. Az egyes táptalajokról az eltérő telepmorfológiai tulajdonságokkal rendelkező különálló telepeket izoláltuk, és a tenyésztéshez használt táptalajjal megegyező összetételű ferde agaron tartottuk fenn.

#### *4.3.2. A baktériumtörzsek sótolerancia vizsgálata*

A sótolerancia vizsgálatot megelőzően a ferde agarról az egyes baktérium törzsekből egy kacsnyit módosított nutrient (DSM-1, [www.dsmz.de](http://www.dsmz.de)) táplevesbe oltottunk át. A módosított tápleves elkészítéséhez 1000 ml vízhez az alapösszetételen felül 5 g NaCl-ot mértünk be, a pH-t 9,0 értékre állítottuk. A beoltott tápleveseket vortexelést követően 1 hétig szobahőmérsékleten inkubáltuk. A táplevesekből baktériumtörzsenként 100  $\mu\text{l}$ -t pipettáztunk 0, 5, 7, 10, 12, és 15%-os NaCl tartalmú nutrient táplevesekbe (pH 9,0). A beoltott kémcsöveket felvortexeltük, majd 1 hétig szobahőmérsékleten inkubáltuk. Ezt követően a tenyészeteket tartalmazó táplevesekből 300  $\mu\text{l}$ -nyi mennyiséget mikrotiter lemezek csövecskéibe pipettáztunk, majd 620 nm-en (Tecan Sunrise, Magellan 3.11. szoftver) megmértük az egyes minták fényelnyelését a steril táplevessel (vak) szemben.

#### *4.3.3. A baktériumtörzsek genotípusos jellemzése*

A tenyésztésbe vont baktériumtörzsekből üveggyöngyös módszerrel izoláltunk DNS-t, melynek során először egy steril Eppendorf-csőbe 100  $\mu\text{l}$  didesztillált vizet mértünk, majd hozzáadtunk egy-egy fém spatula-hegynyit (kb. 200  $\mu\text{l}$ ) üveggyöngyöt. Ebbe egy kacsnyi baktériumot mértünk be, majd sejtmalomban őröltük 30  $\text{sec}^{-1}$  frekvencián 2 percig. A kapott sejtlyúzátumot 10000 rcf-n centrifugáltuk, majd PCR készülékben (Applied Biosystems Gene Amp PCR System 2700 készülék) 98°C-on, 5 percig denaturáltuk. A mintákat ezt követően 10000 rcf-fel, 3 percig centrifugáltuk, majd vortexeltük. A DNS izolálás sikerességének

detektálására a 16S RNS génjét PCR segítségével felszaporítottuk a korábban leírt premix és hőprofil segítségével (LYNCH, J. M. 2003). A kapott PCR termékeket 1%-os agaróz gélben, TBE pufferben megfuttattuk az alábbi módon:

- 1%-os agaróz gél (1 g agaróz + 100 ml 1×TBE puffer) készítettünk, amely 2,5 µl GR Safe DNA StainCat#: IV-1001 (Lab Supply Mall) DNS-be épülő festéket tartalmazott.
- A PCR termék osztérfogatához (30 µl) 5 µl töltőpuffert kevertünk, majd az elegyet a gél zsebeibe pipettáztuk.
- 3 µl 3-as jelzetű DNS molekulasúly markert (M3 λ DNA/*Eco*RI + *Hind*III Marker SM0193, Fermentas, Kanada) az egyik szélső zsebbe mértünk a DNS hosszának meghatározásához.
- 20 percig 100 V-on futattuk a gél 1×TBE pufferben (107,8 g l<sup>-1</sup> Trizma-Base, 55 g l<sup>-1</sup> bórsav, 7,4 g l<sup>-1</sup> EDTA, pH 8,3).
- A csíkokat UV fényben detektáltuk, mert a DNS molekula nagy árkaiba kötődő festék UV-fényben láthatóvá teszi a molekulát.

A baktériumtörzsek csoportosítását az ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) módszerrel végeztük (LYNCH, J. M. 2003). Az egyes törzsek 16S rRNS génszakaszát *Hin*6I és *Bsu*RI enzimekkel emésztettük.

Minden mintához enzimenként a következő premix oldatot mértük össze:

puffer	2 µl
dH <sub>2</sub> O	6,76 µl
enzim	0,24 µl

*A hasításhoz felhasznált reagensek:*

- *Hin*6I 10 u/µl, (Fermentas, #ER0481)
- *Bsu*RI 10 u/µl, (Fermentas, #ER0151)
- 10x BufferTangowith BSA, a *Hin*6I enzim puffere (Fermentas, #BY5)
- 10x Buffer R with BSA, a *Bsu*RI enzim puffere (Fermentas, #BR5),
- Desztillált víz (steril, HPLC tisztaságú)

A premixet 10 µl-enként 0,6 ml-es mikrocentrifuga csövekbe mértük szét és 10-10 µl templátot, vagyis PCR terméket pipettáztunk a reakcióelegyhez. A mintákat átforgattuk, majd lecentrifugáltuk (30 mp, 5500 rcf), ezt követően 37°C-os vízfürdőben három órán keresztül inkubáltuk. Az emésztett DNS terméket agaróz gélelektroforézissel detektáltuk az alábbi módon:

- 2%-os agaróz gél (2 g agaróz + 100 ml 1×TBE puffer) készítettünk, amely 2,5 µl GR Safe DNA Stain Cat#: IV-1001 (Lab Supply Mall) DNS-be épülő festéket tartalmazott.
- Az emésztett PCR termék összterfogatához (20 µl) 5 µl töltőpuffert pipettáztunk. Az első zsebekbe 3 µl 8-as jelzésű molekulasúly markert (pUC Mix Marker; Fermentas) töltöttünk. A gél 80 V-on 80 percig futtattuk 1×TBE pufferben.
- UV fényben detektáltuk a DNS fragmentumok által képzett sávmintázatot, és az eredményt transzilluminátoron (HeroLab, Németország) lefényképeztük.

Az egymással megegyező sávmintázatot adó törzseket azonos ARDRA csoportokba soroltuk Picasa 3 (Google, Egyesült Államok) és Corel DRAW 12 (Corel, Egyesült Államok) szoftverek segítségével.

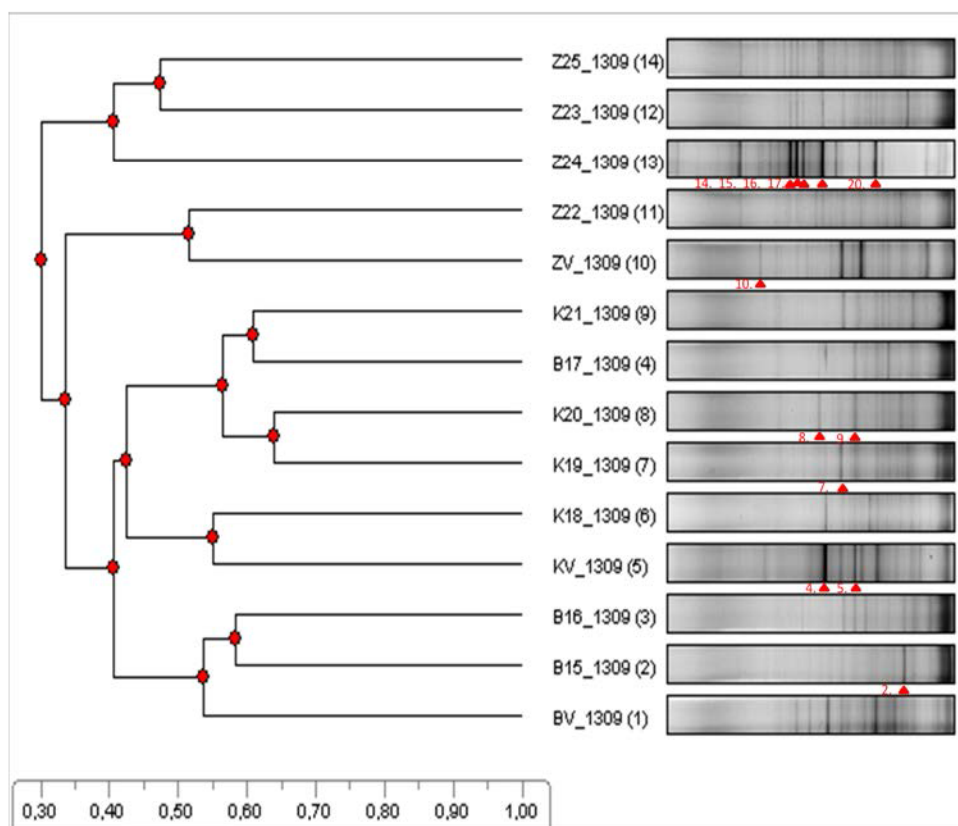
Mindhárom szikes tavi törzscsoportból tíz-tíz reprezentatív törzset választottunk ki, melyeket DNS-éből a 16S rRNS génre specifikus PCR-t készítettünk a korábban leírt módon. A baktériumtörzsek 16S rDNS-ének bázissorrend meghatározása, faji szintű azonosítása és a filogenetikai dendrogram készítése megegyezett a 4.2. fejezetben leírtakkal.



## 5. Eredmények és megvitatásuk

### 5.1. Szikes baktériumközösségek szerkezetének vizsgálata DGGE segítségével

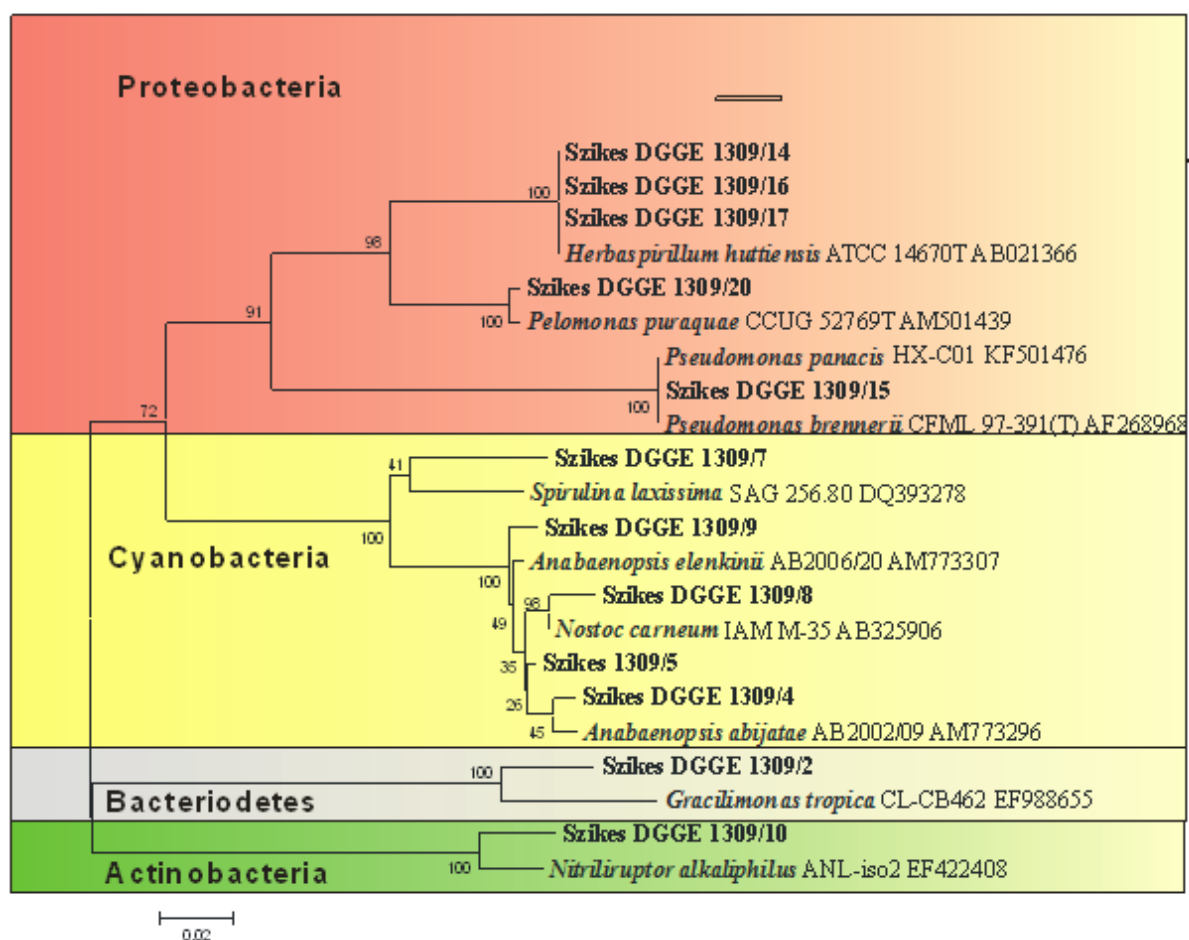
Az összesen 14 kiskunsági szikes víz-, üledék- és rizoszféra mintában előforduló baktériumközösségek DGGE vizsgálata során nyert sávmintázatok összehasonlító elemzését a 4. ábra mutatja. A hasonlósági dendrogramon jól látható, hogy az egyes szikes tavakból származó minták többnyire a mintavételi hely szerint képeztek csoportokat. A víz- és mederüledékből származó minták baktériumközösségét reprezentáló gél-sávok mindhárom szikes tó esetében egymás mellett helyezkedtek el, ami a víz és a hozzá tartozó mederüledék baktériumközösségeinek nagyfokú hasonlóságát mutatja. A rizoszféra minták a baktériumközösségekre jellemző mintázat alapján a víz- és üledékmintáktól elkülönülő csoportokba rendeződtek. A legnagyobb mértékű minták közti eltérés a Zab-székből származó minták esetében mutatkozott. Ezek egymástól és a másik két szikes tóból származó mintáktól is nagymértékben különböztek, amiben feltehetően szerepet játszik, hogy földrajzilag a Zab-szék távolabb helyezkedik el a Kelemen- és a Böddi-széktől.



4. ábra –A szikes tavakból vett minták baktériumközösségeinek összehasonlító dendrogramja

A DGGE segítségével kapott gélképen az egyes csíkoknak egy-egy baktérium taxon feleltethető meg. A gélelektroforézis segítségével elméletileg akár egy bázispárnyi különbség is detektálható, ezért a különböző gélcsávok azonos pozícióiban elhelyezkedő csíkok ugyanannak a taxonnak feleltethetők meg (BORSODI A. et al. 2011). Vizsgálatunk során a 4. ábrán a megjelölt 12 csíkból izolált DNS bázissorrendjét tudtuk azonosítani. Összesen 20 csíkból izoláltunk DNS-t, de a többi kevert szekvenciának bizonyult. A gélképen látható, hogy például a B15 mintából kiválasztott 2. csíknak megfelelő csíkok megjelennek a BV, B16, B17, K19, K21 ZV, Z22, Z23 és Z25 gélcsávokban is. Így egy adott csíkból kinyert DNS azonosítása alapján következtethetünk a faj más mintákban való jelenlétére is.

A szikes minták DGGE vizsgálata során a Betaproteobacteria és a Gammaproteobacteria osztályok, továbbá a Cyanobacteria, a Bacteroidetes és az Actinobacteria törzsek képviselőit tudtuk azonosítani (5. ábra).



5. ábra. –A DGGE alapján azonosított törzsek neighbor-joining módszerrel Kimura-2 korrekcióval készült filogenetikai dendrogramja

A Proteobacteria törzs nagyon heterogén, az ide tartozó baktérium fajok nagyon változatos anyagcserét folytatnak. Számos képviselőjüket írták le tengervizekből, szalinikus és alkalikus környezetekből, továbbá savas élőhelyekről is (HORIKOSHI, K. 2011). A Proteobacteria törzsön belül öt osztályt különíthetünk el (Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Deltaproteobacteria és Epsilonproteobacteria). A Betaproteobacteria kivételével mindegyik osztályban találunk halofil szervezeteket (HORIKOSHI, K. 2011).

A 14-es jelzésű csíkból izolált DNS 100%-os hasonlóságot mutatott a csavart pálcika vagy spirillum alakú *Herbaspirillum huttiense* subsp. *huttiense* alfaj típus törzsével, míg a 16-os jelzésű csíkból izolált DNS 100%-os, a 17-es jelzésű csíkból izolált DNS több, mint 99%-os hasonlóságot mutatott a *Herbaspirillum huttiense* subsp. *putei* alfaj típus törzsével. A 14-es jelzésű csík a Z24-es gélsáv mellett a Z22, Z23, Z25, K19 ZV és BV mintákban is megjelenik, így valószínűsíthetjük a *Herbaspirillum huttiense* subsp. *huttiense* további mintákban való jelenlétét. A 16-os jelzésű csík gyengébb festődéssel, de mindegyik gélsávban látható. A 17-es jelzésű csík a Z22, Z24, Z25, valamint a K19-es gélsávokban is megjelenik. A *Herbaspirillum* genusz taxonómiája az utóbbi években sokat változott, ugyanis a 16S rDNS szekvencia vizsgálatok 99.9%-os homológiát mutattak ki a *Herbaspirillum putei* és a *Herbaspirillum huttiense* fajok között. Ezért a *H. putei* típus törzset *H. huttiense* névre akarták átnevezni, ugyanakkor a *H. putei* genomja mintegy 0.9 Mb nagyságrenddel nagyobb a *H. huttiense* genomjánál. E tény indokolta a *Herbaspirillum huttiense* fajon belül két alfaj elkülönítését, melyek a *Herbaspirillum huttiense* subsp. *huttiense* és a *Herbaspirillum huttiense* subsp. *putei* neveket kapták (DOBRITSA, P. et al. 2009).

A Betaproteobacteria osztályon belül a gram negatív *Pelomonas puraquae* jelenlétét sikerült detektálnunk (GOMILA, M. et al. 2007). A 20-as jelzésű csíknak megfeleltethető csík megjelenik a Z23, Z25, KV, K18, K19, K20, K21, B17, BV, valamint gyengébb festődéssel a B15 és B16 gélsávokban is.

A Gammaproteobacteria osztályba tartozik a legtöbb ismert mérsékelten halofil baktérium genusz. A 15-ös jelzésű csíkból izolált DNS 100 %-os homológiát mutatott a *Pseudomonas brenneri* és *Pseudomonas panacis* faj típus törzseivel. Az aerob, szigorúan respiratórikus anyagcseréjű *Pseudomonas* fajok tipikus szervezetek édes- és tengervízben, talajokban és rizoszféra közösségekben. Ezek a Gram-negatív baktériumok sokoldalú katabolikus aktivitásuk miatt fontos szerepet töltenek be a szerves anyagok mineralizációjában a természetes élőhelyeken, valamint a szennyvíztisztításban, és ipari

folyamatokban (HORIKOSHI, K. 2011). A 15-ös csíknak megfeleltethető csík megjelenik valamennyi Zab-székből származó mintában és a BV gélsávban is.

A Gram-negatív, pálcika alakú *Pseudomonas brenneri* fajt eredetileg franciaországi természetes ásványvizekből, míg a *Pseudomonas panacis* fajt koreai ginseng gyökerekről írták le (BAIDA, N. et al. 2001, PARK, Y.D et al. 2005). A *Pseudomonas* genusz jelenlétét SZABÓ és mtsai (2004) is kimutatták a Kelemen-szék és a Zab-szék üledékéből tenyésztési vizsgálatokkal.

A Cyanobacteria törzs képviselői Gram-negatív, változatos morfológiájú baktériumok. Lehetnek gömb, tojás vagy henger alakúak, sejtjeik állhatnak magányosan vagy kolóniákat, fonalas formákat képezhetnek. Vegetatív sejtjeik mellett speciális funkcióval bíró sejteket (például akinétát, heterocisztát, hormogóniumot) is képezhetnek. Rendkívül jó alkalmazkodóképességüknek köszönhetően mindenfajta víztestben előfordulnak, akár szélsőséges környezeti tulajdonságokkal rendelkező élőhelyeken, hőforrásokban vagy hévizekben is megtalálhatóak (HORIKOSHI, K. 2011). Az általunk vizsgált szikes tavakból a Nostocaceae és a Prochlorotrichaceae családok képviselőit sikerült kimutatnunk. A Nostocaceae családba tartozó *Anabaenopsis abijatae* típustörzsével 98%-os hasonlóságot mutatott a 4-es jelzésű csíkból izolált DNS, míg az *Anabaenopsis elenkinii* típustörzsével 97 és 98%-os hasonlóságot mutatott az 5-ös és a 9-es jelzésű csíkokból izolált DNS. Az *Anabaenopsis abijatae* baktériumot először a Kenyában található, alkalikus és szalinikus Abijate tóból írták le, míg az *Anabaenopsis elenkinii* típustörzsét elsőként ugandai sós tavakból izolálták. Fonalakat képeznek, melybe vegetatív sejtek és heterociszták tömörülnek. Az *Anabaenopsis abijatae* és az *Anabaenopsis elenkinii* 16S rDNS szekvencia vizsgálatok alapján nagyfokú hasonlóságot mutat egymással, de morfológiai különbségeik és PC-IGS szekvenciájukban mutatkozó alacsony hasonlóságuk alapján indokoltá vált a két genusz elkülönítése (BALLOT A, et al. 2007). Az *Anabaenopsis* nemzetség képviselőinek jelenlétét a kiskunsági szikes kistavakban FELFÖLDI és mtsai (2008) is igazolták. A 4-es jelzésű csík igen változó erősséggel, de valamennyi gélsávban megjelenik. Az 5-ös és a 9-es jelzésű csík a B17 és K21 gélsávok kivételével mindegyik gélsávban látható, ami ezeknek a cianobaktériumoknak a KNP területén való általános előfordulására utal. A Cyanobacteria törzsön belül a KNP mintákban a Prochlorotrichaceae családba tartozó *Spirulina* genusz is megjelent. A 7-es jelzésű csíkból izolált DNS alacsony, 91%-os hasonlósági aránya miatt faji szintű azonosítást nem tudunk tenni. A 7-es jelzésű csík a B17 és K21 kivételével a többi gélsávban is előfordult.

A Bacteroidetes törzsön belüli három osztály, a Bacteroidia, a Flavobacteria és a Sphingobacteria egyaránt tartalmaz halofil baktériumokat. (HORIKOSHI, K. 2011). A 2-es jelzésű DNS minta (mely mindegyik gélsávban látható) 90%-os hasonlóságot mutatott a Bacteroidia osztály egyik képviselőjével. Az alacsony szekvencia hasonlóság miatt faji szintű azonosítást nem tudunk tenni. 2008 júniusában a Böddi-szék vízszintje egy hosszabb ideig tartó szárazság és a magas hőmérséklet miatt nagyon lecsökkent, és a tó vizében alga tömegprodukció jelent meg. Ekkor a szikes kistó vizének baktériumközösségében nagy számban fordultak elő a Bacteroidetes törzsbe tartozó, mérsékelt halofil szervezetek (BORSODI A. et al. 2011).

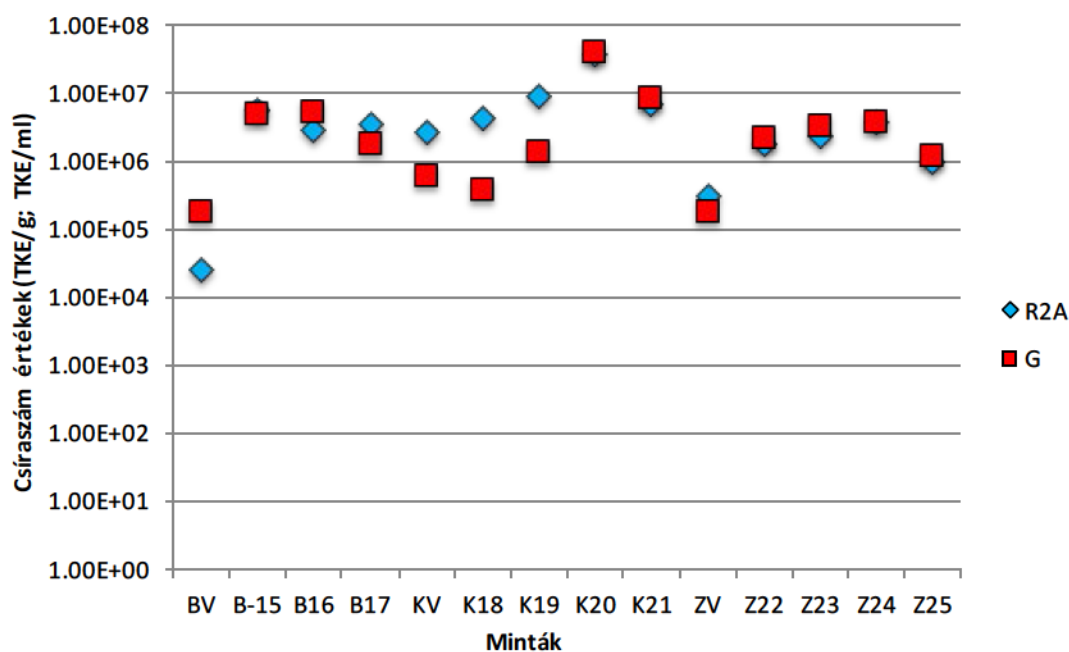
A Bacteria doménen belül a legnépesebb törzs az Actinobacteria. Képviselőik a gömb alaktól a feldarabolódó hifaformákon át a különböző micélium alakokig nagyon változatos morfológiájúak lehetnek. Vannak köztük patogének (*Corynebacterium*, *Mycobacterium*), növényi kommenzalisták (*Leifsonia*), nitrogén-fixáló szimbionták (*Frankia*), a gasztrointesztinális rendszer kommenzalistái (*Bifidobacterium*) és talajlakók (*Streptomyces*) is. Extracelluláris enzimek és másodlagos metabolitjaik változatosak, utóbbiak potenciális antibiotikumok lehetnek, melyeket a gyógyszeriparban hasznosítanak. A talajban élő aktinobaktériumok fontos szerepet töltenek be a szerves anyagok dekompozíciójában és humifikációs folyamatokban (VENTURA, M. et al. 2007).

A 10-es jelzésű csíkból izolált DNS 91%-os hasonlóságot mutatott a *Nitrospirillum alkaliphilum* faj típustörzsével, ám az alacsony hasonlóság miatt faji szintű azonosítást nem tehetünk. A *Nitrospirillum alkaliphilum* faj típustörzsét eredetileg a Kulunda sztyeppen (Altaj, Oroszország) található szóda tavakból írták le. 0,5 és 11% közötti sókoncentrációnál mutat növekedést, növekedési optimuma 1,1-1,7%-os sótartalom esetén figyelhető meg (SOROKIN, D. Y. et al. 2009). A 10-es jelzésű csíknak megfeleltethető csíkok a ZV mellett a Z24 és Z25 gélsávokban láthatók.

## **5.2. Csíraszámbebecslés, az izolált baktériumtörzsek növekedésének vizsgálata**

A szélesztéssel fertőzött táptalajok egy hetes inkubációját követően végeztünk csíraszámbebecslést (6. ábra). A glükózos (G) és az R2A (R) táptalajon a legtöbb minta esetében közel azonos csíraszámot határoztunk meg. Ez alól a Böddi-szék víz-, továbbá a Kelemen-szék víz-, üledék- és zsiókás rizoszféra mintái képeztek kivételt, ahol közel egy nagyságrendnyi eltérést tapasztaltunk a kétféle táptalajon. A legnagyobb csíraszámot R2A

táptalajon a Kelemen-szék rókasásos rizoszférájában határoztuk meg ( $3,9 \times 10^7$  TKE g<sup>-1</sup>), míg a legkisebb csíraszám értéket a Böddi-vízből vett minta glükózos táptalajra való szélesztése esetén ( $2,5 \times 10^4$  TKE ml<sup>-1</sup>). Mindhárom szikes tó esetében a vízmintákból kisebb csíraszám értékeket határoztunk meg, mint az üledék- és rizoszféra mintákból.

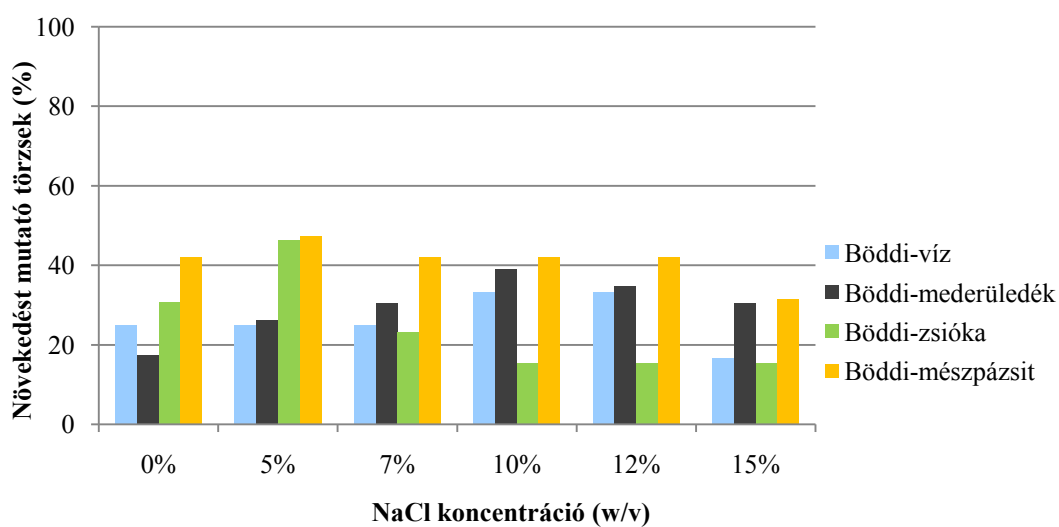


6. ábra–A szikes mintákból tenyésztéssel becsült csíraszám értékek

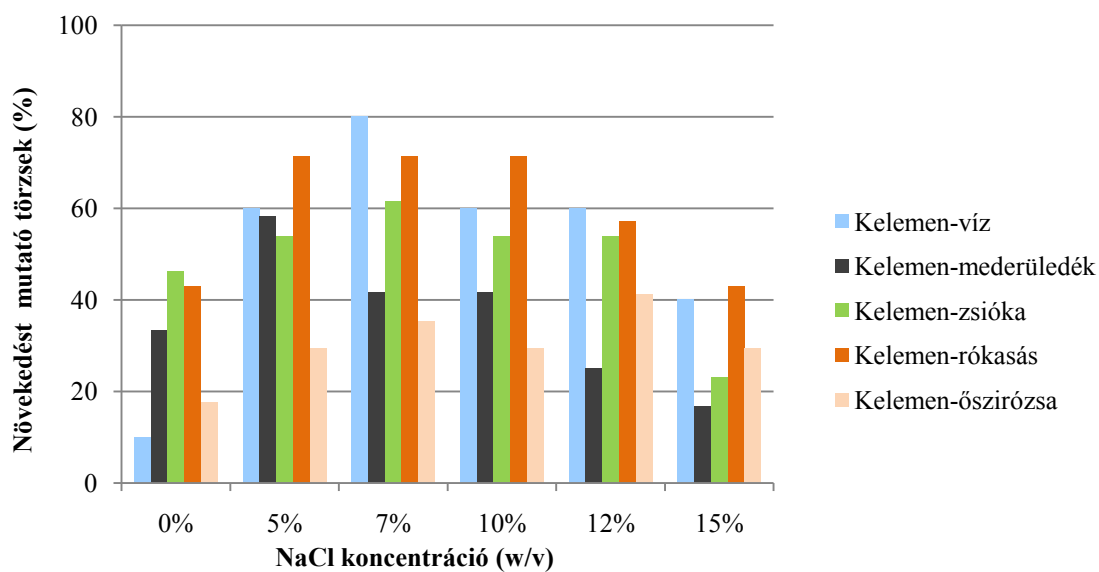
A szikes mintákból a kétféle táptalajról összesen 301 baktériumtörzset izoláltunk. A Böddi-székéből izolált 124 törzsből 86-ot, a Kelemen-székéből izolált 102 törzsből 78-at, a Zab-székéből izolált 75 törzsből 58-at sikerült laboratóriumi körülmények között fenntartani.

### 5.3. A baktériumtörzsek sótoleranciója

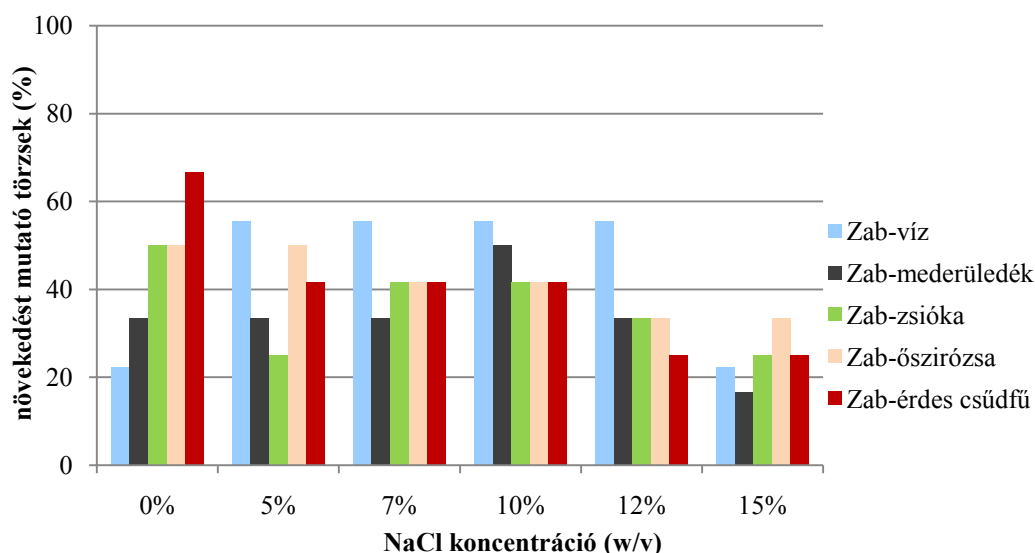
A tenyésztésbe vont baktériumtörzsek különböző sókoncentrációjú táplevesekben történő növekedésére a fényelnyelés mértékéből következtettünk. A növekedés meghatározásához először kiszámoltuk az egyes mintavételi helyszínekről izolált törzsek 0, 5, 7, 10, 12 és 15 %-os sókoncentráción mutatott OD értékeinek átlagát. Ezt követően egy kétváltozós adathalmazt készítettünk aszerint, hogy egy adott mintán belül az izolált törzsek az átlagnál nagyobb (1) vagy kisebb (0) értéket mutattak. Az átlagnál nagyobb OD értéket mutató baktériumtörzsek mintavételi helyek szerinti százalékos arányát a 7., 8. és 9. ábrák szemléltetik.



7. ábra – A különböző sókoncentrációjú táplevesekben az átlagnál nagyobb OD értéket mutató baktériumtörzsek százalékos aránya a Böddi-székről származó mintákban



8. ábra – A különböző sókoncentrációjú táplevesekben az átlagnál nagyobb OD értéket mutató baktériumtörzsek százalékos aránya a Kelemen-székről származó mintákban



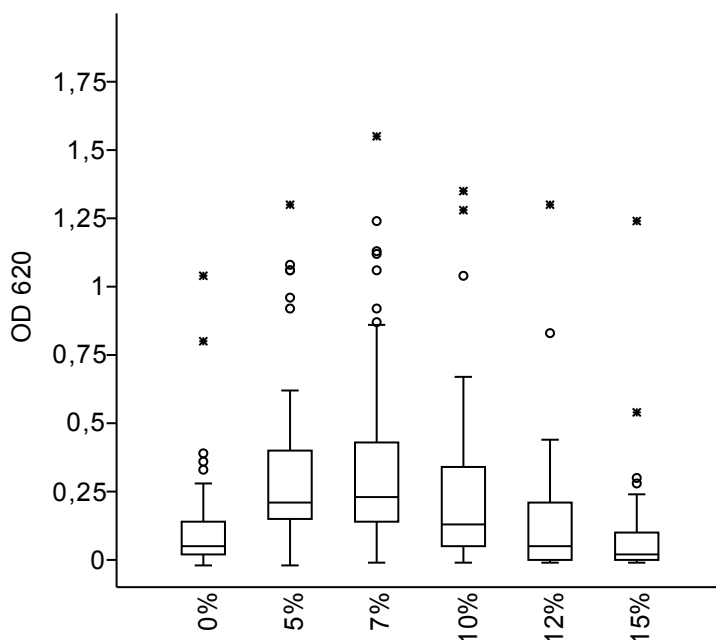
**9. ábra – A különböző sókoncentrációjú táplevesekben az átlagnál nagyobb OD értéket mutató baktériumtörzsek százalékos aránya a Zab-székről származó mintákban**

Az ábrákon jól látható, hogy az egyes mintákból izolált baktériumtörzsek különböző sókoncentrációkon való növekedése normális eloszlást mutat. A Böddi-szék esetében az átlaghoz képest jóval gyengébben nőttek a baktériumtörzsek, mint a Zab-szék és Kelemen-szék esetében. NAVARRO és mtsai (2009) mérési eredményei alapján elmondható, hogy a szikes tavaktól távolodva a talaj sókoncentrációja csökken. A kiskunsági szikesekből kitenyésztett baktériumtörzsek sótoleranciája a minta típusa szerint is különbözött. A 0%-os sókoncentráción főként a vízparttól legtávolabb elhelyezkedő növények gyökérkörnyezetéből izolált törzsek mutattak nagyfokú növekedést (pl. Böddi-szék mészpázsit, Kelemen-szék rókasás, Zab-szék érdes csüdfű, őszirózsa minták). Eredményeink alapján az is látható, hogy a három tó esetében az ugyanolyan mintából (pl. a zsióka rizoszférából) származó baktériumtörzsek az eltérő sókoncentrációk mellett más-más növekedési mintázatot mutattak (a Böddi-szék esetében 5%-nál, a Kelemen-szék esetében 7%-nál, míg a Zab-szék esetében 0%-nál volt a legnagyobb arányú a növekedés). A zsióka által benőtt vízparti területek az év egy részében tartós vízborítottság alatt állnak, ám az aszályosabb időszakban kiszáradnak, ami a talajfelszín sókoncentrációjának emelkedését idézi elő (BOROS E. 2007). Feltehetően a talaj sókoncentrációjának ingadozásához való alkalmazkodóképességet tükrözi, hogy a zsióka rizoszférából izolált baktériumtörzsek széles sótoleranciával és különböző optimummal jellemezhetők. Ugyanakkor néhány vízparttól távolabbi mintavételi helyről származó törzs is jelentős növekedést mutatott a magasabb sókoncentráció értékeken is (például Böddi-szék

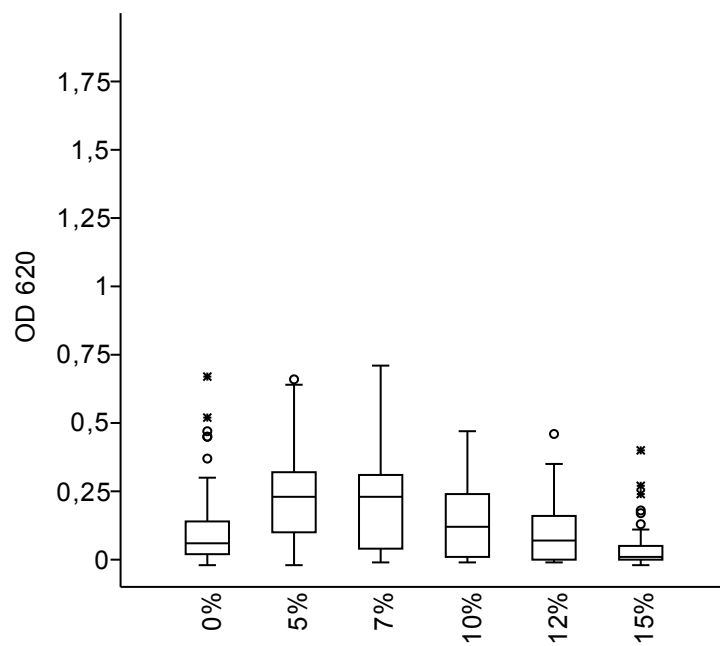


mészpázsit, Kelemen-szék rókasás, őszirózsa, Zab-szék őszirózsa, érdes csúdfű), ami utal, hogy a szélsőséges viszonyokhoz is jól alkalmazkodó fajok élnek a szikes tavak mentén.

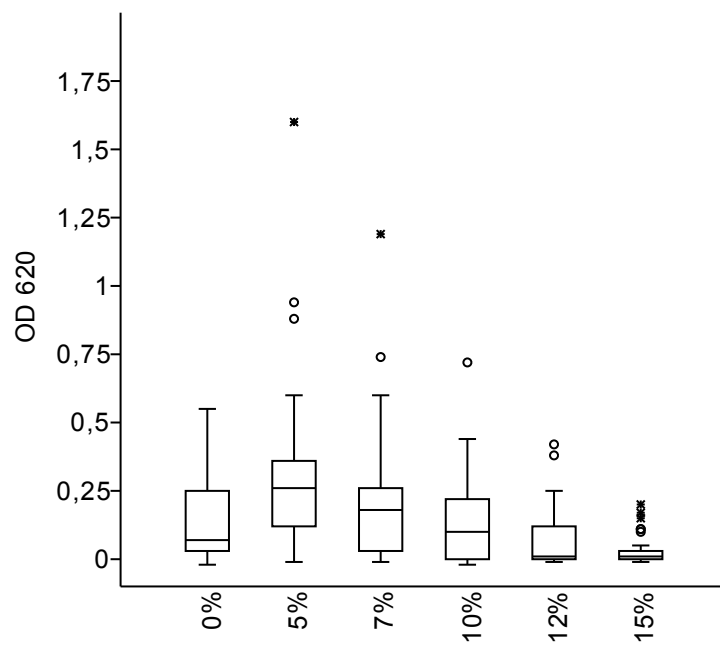
Az egyes székekről izolált törzsek különböző sókoncentráción való növekedését mutató adatsorból boxplot diagramokat is készítettünk a PAST 3.01 program segítségével (10., 11., 12. ábrák). A diagramon a „box” az adatok 50%-át foglalja magába, a benne elhelyezkedő vízszintes vonal a mediánt jelöli. Az alsó függőleges kinyúló vonallal mutatja az adatok azon 25%-át, melyek a legalacsonyabb (alsó negyed), a felső függőleges vonallal mutatja az adatok azon 25%-át, melyek a legmagasabb értékkel rendelkeznek (felső negyed). A belső határoló pontokat úgy kapjuk meg, hogy a „box” alsó részét határoló, alsó negyedelő ( $Q_1$ ) értékből kivonjuk, a „box” felső részét határoló, felső negyedelő ( $Q_3$ ) értékhez pedig hozzáadjuk a „box”-on belüli, vagyis interquartilis terjedelem (IQR) másfélszeresét. A külső határoló pontokat úgy kapjuk meg, hogy a  $Q_1$  pontból kivonjuk, és a  $Q_2$  ponthoz pedig hozzáadjuk az IQR háromszorosát. A belső határoló ponton kívül eső, de a külső határoló ponton belül elhelyezkedő értékek – enyhe outlierok, – körrel, míg a külső határoló ponton kívüli értékek – extrém outlierok – csillaggal vannak jelölve (NICOLAOU, G. et al. 1989).



10. ábra – A Böddi-székből izolált baktériumtörzsek NaCl tolerancia boxplot diagramja



11. ábra – A Kelemen-székben izolált baktériumtörzsek NaCl tolerancia boxplot diagramja

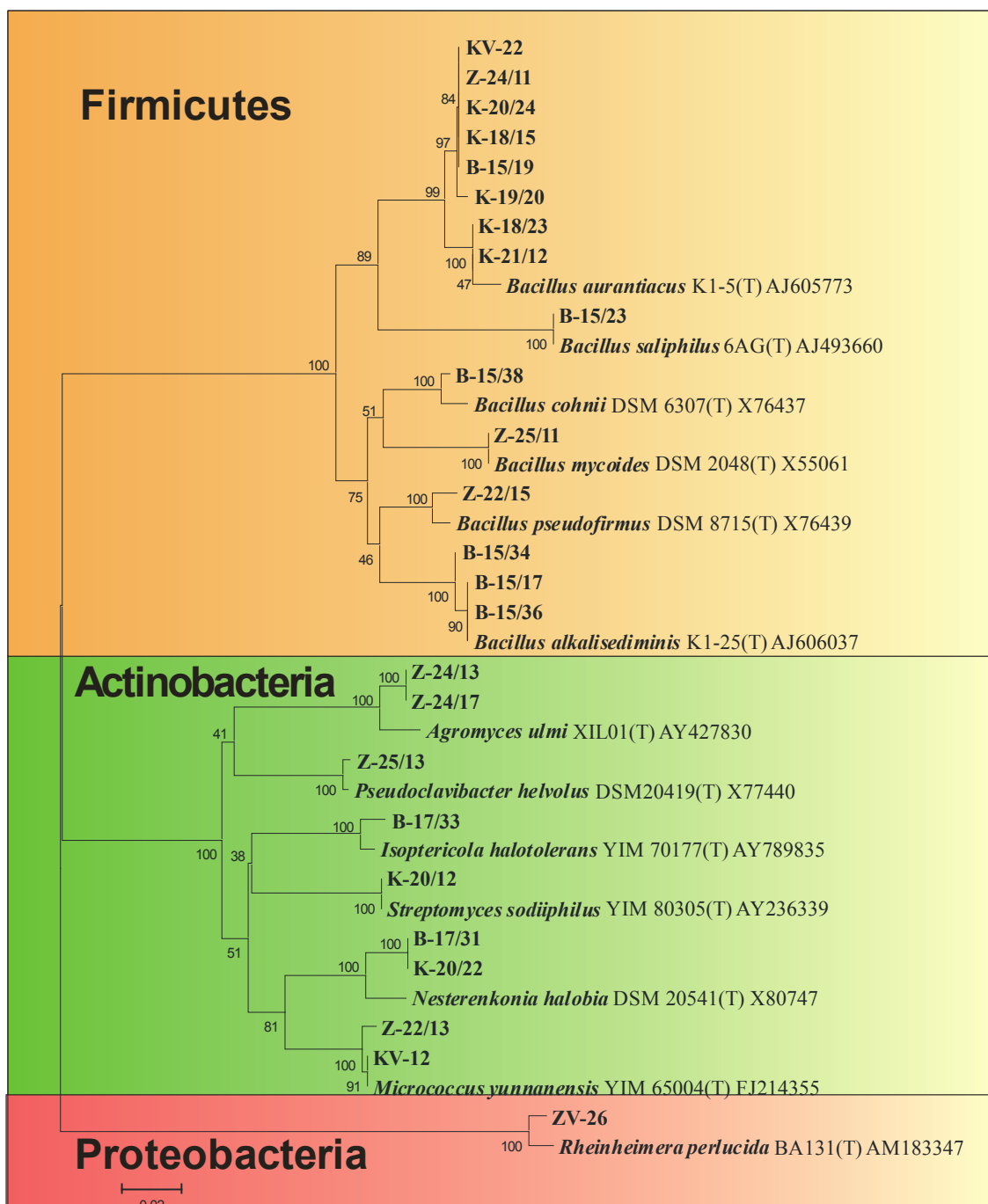


12. ábra – A Zab-székben izolált baktériumtörzsek NaCl tolerancia boxplot diagramja

Mindhárom boxplot diagramon láthatjuk, hogy az izolált törzsek nagy része 5 és 7%-os sókoncentrációk mellett mutatta a legnagyobb növekedést. Ekkor voltak a legmagasabbak a maximum értékek, valamint a Kelemen-szék kivételével a legtöbb outlier érték is itt jelent meg. Ekkor egy széken belül együttesen vizsgáltuk meg az egyes törzsek növekedését, de az egyes székeken belül nagyon különböző sókoncentrációjú helyekről származtak a minták, ezért bizonyos törzsek nagyon jól, mások nagyon gyengén növekedtek ugyanakkora sókoncentrációjú táplevesben. A Böddi- és a Kelemen-szék esetében a 0 és 15%-os sókoncentrációknál kevés törzs növekedett. A minimum értékek szinte egyáltalán nem, míg a maximum értékek csak kis mértékben tértek el a boxon belül található értékekhez képest, vagyis a törzsek nagy része többnyire ugyanúgy reagált a táplevesben megjelenő szélsőségesen alacsony és magas sókoncentrációkra. Ugyanakkor itt kaptuk a legtöbb outlier adatot, ami azt mutatja, hogy néhány törzs jól tudott alkalmazkodni az extrém sókoncentrációhoz is. A Zab-székből izolált törzsek nagy része 0%-os sókoncentráció mellett is jól tudott növekedni, itt nem kaptunk outlier értékeket sem. 15%-os sókoncentráció mellett azonban nagyon gyengén növekedtek a törzsek, ami annak is köszönhető, hogy a Zab-szék környezetéből származnak a vízparttól legtávolabb elhelyezkedő talajminták. A vízparttól távolodva a talaj sókoncentrációja fokozatosan csökken, feltehetően ezért mutattak gyengébb növekedést a Zab-székről izolált törzsek a nagyobb sókoncentrációkon, míg jól növekedtek az alacsonyabb sókoncentrációkon. Ugyanakkor a 15%-os sótartalomnál mért OD értékek között sok outlier jelent meg, ami azt mutatja, hogy a Zab-székről izolált egyes törzsek jól tudtak növekedni a nagy sóstressz ellenére is.

#### **5.4. A tenyésztési vizsgálatokkal azonosított baktériumtörzsek**

A KNP területén elhelyezkedő szikes tavak baktériumközösségeinek feltárására korábban BORSODI és mtsai (2005) végeztek tenyésztési és tenyésztéstől független vizsgálatokat. Tenyésztéssel aerob heterotróf, túlnyomórészt Gram-pozitív, mérsékelten halofil fajok jelenlétét mutatták ki (BORSODI A. et al. 2005; POLLÁK B. et al. 2006). Jelen tenyésztési vizsgálataink során eddig a Firmicutes, Actinobacteria és Proteobacteria törzsek jelenlétét sikerült kimutatnunk (13. ábra).



13.ábra –A szikes mintákból azonosított baktériumtörzsek neighbor-joining módszerrel és Kimura-2 korrekcióval készült filogenetikai dendrogramja

Az azonosított törzsek csaknem 40%-a a Firmicutes törzsbe tartozó *Bacillus* genusz képviselője volt. A kis G+C tartalmú, Gram-pozitív *Bacillus* fajok a természetben széles körben elterjedtek, nagyon változatos csoportot alkotnak, a természetes és antropogén eredetű szerves anyagok biodegradációs folyamataiban jelentős szerepet töltenek be tág enzimspektrumuknak köszönhetően. Nem igényelnek speciális tápanyagokat tenyésztésükhöz (FAJARDO-CAVAZOS, P. és NICHOLSON, W. 2006). NaCl igényük is nagyon különböző, közöttük

halofil és halotoleráns szervezeteket egyaránt találunk. Az utóbbi években a *Bacillus* genusz számos képviselőjét mutatták ki a világ különböző hipersalin élőhelyeiről, például a kaliforniai Mono tóból, a mongóliai Channagor tóból, valamint a kenyai Bogoria szóda tóból. Spóráképző baktériumok lévén a szélsőségesen változó környezeti feltételeket is túlélnek. Megtalálhatók talajokban, tengeri üledékekben és a víztestben, valamint élelmiszerekben is (FAJARDO-CAVAZOS P. ÉS NICHOLSON W. 2006).

A Firmicutes törzsön belül az általunk azonosított törzsek (B-15/19, K-18/15, K-18/23, K-19/20, K-20/24, K-21/12, KV-22, Z-24/11) legnagyobb részét a *Bacillus aurantiacus* fajba soroltuk, melyek mindhárom vizsgált kiskunsági székben (a Böddi-szék mederüledékében, a Kelemen-szék mederüledékében, vízében, a Kelemen-szék közelében növő zsióka, rókasás és őszirózsa növények rizoszférájában, valamint a Zab-szék közelében növő őszirózsa gyökérkörnyezetében is) megtalálhatóak voltak. A szekvenciák hasonlósága 97-99% között változott. Az alkalofil, mérsékelt halofil *Bacillus aurantiacus* fajt eredetileg a Kelemen-szék üledékéből írták le (BORSODI A. et al. 2008), növekedési optimuma 3-7%-os sótartalom mellett figyelhető meg. Vizsgálatunk során a B-15/19 törzs 0-7%-os, a K-18/15 és K-18/23 törzs 5-7%-os, a K-20/24 törzs 0-5%-os, a K-21/12 és KV-22 5%-os, a Z-24/11 törzs 7%-os sókoncentráció mellett növekedett. Ezek a törzsek tehát a faj típustörzséhez képest tágabb sókoncentráció tartományban növekedtek.

A Böddi-szék mederüledékéből izoláltuk az alkalitoleráns és halotoleráns, coccus alakú *Bacillus saliphilus* faj képviselőjét. Az általunk izolált B-15/23 törzs csaknem 99%-os hasonlóságot mutatott a típustörzssel. A fajt egy a Dél-olaszországi, Campania régióban található magas ásványi anyag tartalmú kis tóból írták le, és a 16S rDNS szekvencia adatok alapján nagy hasonlóságot mutatott különböző kínai és kenyai szóda tavakból leírt fajokhoz. 1-25%-os sótartalom között mutat növekedést, növekedési optimuma 16%-os sótartalom mellett figyelhető meg (ROMANO I. et al. 2005). Az általunk izolált törzs a típustörzshöz képest alacsonyabb, 5-10%-os sókoncentráció mellett mutatott növekedést.

A *Bacillus cohnii* faj képviselőjét a Böddi-szék mederüledékéből izoláltuk. Az azonosított törzs (B-15/38) 97.83 %-os hasonlóságot mutatott a típustörzssel. A fajt először németországi és dán talajmintákból mutatták ki. A *Bacillus cohnii* obligát alkalofil baktérium, növekedési optimuma 5%-os NaCl koncentráción figyelhető meg (SPANKA R.-FRITZE D. 1993). A Böddi-szék mederüledékéből izolált B-15/38 törzs 5-7%-os sótartalom mellett mutatott növekedést.

A Z-25/11 törzs 100%-os hasonlóságot mutatott a *Bacillus mycoides* faj típustörzsével. Az általunk izolált törzs egy, a Zab-széken növé érdes csüdfü rizoszférájából került elő, 0-5 %-os sótartalom mellett növekedett.

A pálcika alakú, alkalofil *Bacillus pseudofirmus* fajjal egy törzs (Z-22/15) mutatott 98.45 %-os hasonlóságot. A faj növekedési optima pH 9 és kb. 16%-os sótartalom esetén figyelhető meg (NIELSEN, P. et al. 1995). Az általunk izolált Z-22/15 törzs alacsonyabb, 5-7%-os sókoncentráción növekedett.

A *Bacillus alkalisediminis* fajba sorolt törzseket a Böddi-szék üledékéből izoláltuk. Az azonosított törzsek (B-15/17, B-15/34, B-15/36) több mint 99%-os hasonlóságot mutattak az adatbázisban található típustörzssel. A pálcika alakú, nem mozgó *Bacillus alkalisediminis* fajt a Kelemen-szék üledékmintáiból írták le (BORSODI A. et al. 2011). A *Bacillus alkalisediminis* típustörzse 2-10%-os sókoncentráció között mutatott növekedést, növekedési optima 5%-os sótartalom mellett figyelhető meg (BORSODI A. et al. 2011). Az általunk izolált, *Bacillus alkalisediminis* fajként azonosított törzsek a típustörzshöz hasonlóan 5-7% sókoncentráció között mutattak növekedést.

Az Actinobacteria törzsön belül a Microbacteriaceae családba tartozik az *Agromyces* nemzetség, melynek képviselőit a legkülönbözőbb talajokból izolálták, az *A. aurantiacus* törzseket például öserdei talajokból, az *A. ramosus* törzseket többek között trágyázott rétektől és terméketlen sivatagokig mindenféle talajmintákból (RIVAS, R. et al. 2004). A genusz képviselőit tenyésztési vizsgálatokkal már korábban is kimutatták a Zab-szék és a Kelemen-szék üledékéből (SZABÓ G. et al. 2004). Az általunk izolált törzsek (Z-24/13, Z-24/17), melyek a Zab-szék öszi rizoszférájából származtak, 98%-os hasonlóságot mutattak az *Agromyces ulmi* faj típustörzsével, melyet szilfa (*Ulmus nigra*) törzséről izoláltak (RIVAS, R. et al. 2004). Az általunk izolált mindkét törzs 0-7%-os sótartalom mellett növekedett. A család másik képviselője a *Pseudoclavibacter helvolus* fajhoz leginkább hasonlító törzset (Z-25/13) szintén a Zab-székről, egy ott növé érdes csüdfü rizoszférájából izoláltuk, a hasonlóság csaknem 100% volt. Szabálytalan pálcika alakú baktérium, pH 6-10 között, nagyon alacsony sókoncentráción (1%) mutat növekedést. Ökológiai jelentősége a molinát herbicid degradációs képességében nyilvánul meg (MANAIA, C.M. et al. 2004). Az általunk izolált Z-25/13 törzs a faj típustörzsénél magasabb, 0-5%-os sótartalom mellett növekedett.

Az Actinobacteria törzsön belül, a Promicromonosporaceae családba tartozik az *Isoptericola halotolerans*, melyet eredetileg az Északnyugat Kínában található Qinghai tartomány sós talajmintáiból izoláltak. Vizsgálataink során a Böddi-szék *Puccinellia* rizoszférájából izolált törzs (B-17/33) 94%-os hasonlóságot mutatott az *Isoptericola*

*halotolerans* faj típustörzsével. A halotoleráns, gömb vagy pálcika alakú baktériumok növekedési optimuma 10% NaCl koncentrációnál mérhető (ZHANG, Y.G. et al. 2005). Az általunk izolált törzs az optimális sókoncentráción túl 5-12%-os sókoncentráció mellett is növekedett.

Szintén Qinghai tartományból vett talajmintákból írták le a Streptomycetaceae család egyik képviselőjét, a *Streptomyces sodiiphilus* fajt. A Kelemen-szék rókasás rizoszférájából izolált egyik törzs (K-20/12) 100%-os hasonlóságot mutatott a *Streptomyces sodiiphilus* típustörzsével, mely 3% NaCl koncentráció mellett mutat optimális növekedést (LI, W.J. et al. 2005). Az általunk izolált K-20/12 törzs a típustörzshöz képest magasabb, 5%-os sótartalom mellett mutatott optimális növekedést.

A Micrococcaceae családba tartozó mérsékelten halofil, gömb alakú sejtekkel rendelkező *Nesterenkonia halobia* fajhoz legnagyobb hasonlóságot mutató törzseket a Böddi-szék mészpázsit és a Kelemen-szék rókasás rizoszférájából izoláltuk (B-17/31, K-20/22). Mindkét törzs az általunk vizsgált valamennyi sókoncentrációnál jól növekedett. Mindkét esetben több, mint 97 %-os szekvencia hasonlóságot figyelhattunk meg az izolált törzsek és a típustörzsek között (STACKEBRANDT, E. et al. 1995). A család másik képviselőjéhez, a *Micrococcus yunnanensis* faj típustörzséhez a Kelemen-szék vizéből és a Zab-szék mederüledékéből izolált KV-12 és Z-22/13 törzs mutatta a legnagyobb, csaknem 100%-os hasonlóságot. A *Nesterenkonia* és *Micrococcus* genuszok jelenlétét már korábban is kimutatták a Zab-szék és a Kelemen szék üledékéből (SZABÓ G. et al. 2004). A *Micrococcus* nemzetség tagjai a nyugodt nyílt víz tipikus lemezelhető obligát aerob baktériumai, melyek jól tolerálják a környezet sókoncentrációjának ingadozását, de jellemző kolonizálói az emlőállatok bőrfelületének is. A *Micrococcus yunnanensis* baktériumot eredetileg a *Polyspora axillaris* növény gyökeréből izolálták, mint endofita baktériumot (ZHAO, Z.G. et al. 2009). Az általunk izolált KV-12 törzs 0-7%-os, a Z-22/13 törzs 5-10%-os sókoncentráció mellett mutatott optimális növekedést.

A Zab-szék vizéből izolált ZV-26 törzs 98%-os hasonlóságot mutatott a *Rheinheimera perlucida* faj típustörzsével, melyet eredetileg a Balti-tenger középső területének felszíni vízrétegéből izoláltak. 0-8 % sókoncentráció mellett mutat növekedést, növekedési optimuma 1-3% sótartalom mellett figyelhető meg (BRETTAR, I. et al. 2006). A ZV-26 törzs a faj típustörzsénél alacsonyabb, 0%-os sótartalom mellett növekedett legjobban.

## 6. Összefoglalás

A változatos szikes élőhelyeken kialakuló szélsőséges körülményekhez számos sótűrő növényfaj és „sókedvelő”, halofil mikroorganizmus alkalmazkodott. A Kiskunsági Nemzeti Park (KNP) területén található Böddi-szék, Kelemen-szék és Zab-szék vizéből és üledékéből, továbbá a vízparton élő szikes növények rizoszférájából 2013 szeptemberében összesen 14 helyen vettünk mintát.

A különböző mintákra jellemző baktériumközösségek szerkezetét egy molekuláris biológiai ujjlenyomat módszer, a DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) segítségével hasonlítottuk össze. Eredményeink alapján a víz- és mederüledék minták baktériumközösségeinek szerkezete mutatta egymáshoz a legnagyobb hasonlóságot. A Zab-székből származó minták baktériumközösségei egymástól és a másik két szikes tó közösségeitől is nagymértékben különböztek. A DGGE alapján a Betaproteobacteria és a Gammaproteobacteria osztályok, továbbá a Cyanobacteria, a Bacteroidetes és az Actinobacteria törzsek képviselőit mutattuk ki.

A mintákból szelektív táptalajok felhasználásával  $3,9 \times 10^7$  TKE g<sup>-1</sup> és  $2,5 \times 10^4$  TKE ml<sup>-1</sup> közötti csíraszám értékeket határoztunk meg. Mindhárom szikes tó esetében a vízmintákból becsültük a legalacsonyabb csíraszámot. A rizoszféra minták esetében átlagosan  $6,86 \times 10^6$  TKE g<sup>-1</sup> csíraszám értéket kaptunk.

A mintákból összesen 300 baktériumtörzset vontunk tenyésztésbe. Az egyes törzsek sótoleranciáját 0% és 15% közötti sókoncentrációjú táplevesekben való növekedésük alapján állapítottuk meg. Mindhárom szikes tó esetében 5-7%-os sótartalom esetén tapasztaltuk a legintenzívebb növekedést. A baktériumtörzsek sótoleranciájában mintavételi helytől és minta típusától függő eltérést is megfigyeltünk.

A baktériumtörzsek faji hovatartozását ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) csoportosításukat követően a 16S rDNS bázissorrendjének meghatározása alapján végeztük el. Ennek során a Firmicutes, a Proteobacteria és Actinobacteria törzsek képviselőit mutattuk ki. A világ számos pontján előforduló hiperszalin élőhelyről is kimutatott halofil fajok mellett, a kiskunsági szikes tavakból leírt *Bacillus* fajok képviselőit azonosítottuk a legnagyobb arányban.



## 7. Irodalomjegyzék

- BAIDA N. –YAZOURH A. –SINGER E.–IZARD D. 2001: *Pseudomonas brenneri* sp. nov., a new species isolated from natural mineral waters. –*Research in Microbiology* 152 (5):493-502.
- BALLOT A. –DADHEECH P. K.– HAANDE S.–KRIENITZ L. 2008: Morphological and Phylogenetic Analysis of *Anabaenopsis abijatae* and *Anabaenopsis elenkinii* (Nostocales, Cyanobacteria) from Tropical Inland Water Bodies –*Microbial Ecology* 55: 608-618.
- BOROS E. 1999: A magyarországi szikes tavak és vizek ökológiai értékelése.– *Acta Biologica Debrecina Oecologica Hungarica* 9. 13–80.
- BOROS E. 2002: Szikes tavak. –*Nemzeti ökológiai hálózat* 4. 1–24.
- BOROS E. 2007: Vízimadarak és fontos háttérváltozók szerepe fehér szikes vizek trofikus kapcsolataiban – *Doktori (PhD) értekezés* pp. 9-10, 29-30.
- BORSODI A. –BESZTERCEI B. –RESKÓNÉ N. M.–MICSINAI A. – MÁRIALIGETI K. 2001: A Velencei-tó üledékéből kitenyésztett alkalofil baktériumtörzsek fenotípusos jellemzése – *Hidrológiai Közlöny* 81: 334–336.
- BORSODI A. K.–MÁRIALIGETI K.–SZABÓ G.–PALATINSZKY M.–POLLÁK B.–KÉKI ZS.–KOVÁCS A. L.– SCHUMANN P.– TÓTH E. M. 2008: *Bacillus aurantiacus* sp. nov., an alkaliphilic and moderately halophilic bacterium isolated from Hungarian soda lakes.–*International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58, 845–85.
- BORSODI A. –KNÁB M. –CZEIBERT K. –MÁRIALIGETI K. –VÖRÖS L. –SOMOGYI B. 2013: Planktonic bacterial community composition of an extremely shallow soda pond during a phytoplankton bloom revealed by cultivation and molecular cloning – *Extremophiles* 17: 575-584.
- BORSODI A. –KOSÁROS T. –JANURIK E. –KNÁB M. – KRETT G. –KEREPECZKI É. –MÁRIALIGETI K. – PEKÁR F. 2011: Adatok egy termálvíz befogadására szolgáló hűtő-tározó tó vízkémiai és mikrobiológiai jellemzőiről– *Hidrológiai Közlöny* 91. Évf. 6.sz. 33-36.
- BORSODI A. –POLLÁK B. –KÉKI ZS. –RUSZNYÁK A. –KOVÁCS A. L. – SPRÖER C. –SCHUMANN P. – MÁRIALIGETI K. – TÓTH E. M. 2011: *Bacillus alkalisediminis* sp. nov., an alkaliphilic and moderately halophilic bacterium isolated from sediment of extremely shallow soda ponds.– *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 8. 1880-1886.

- BORSODI A.–KNÁB M. –CZEIBERT K. –PALATINSZKY M. –KRETT G. –SOMOGYI B. –VÖRÖS L. –MÁRIALIGETI K. 2010: Diverzitás vizsgálatok a Böddi-szék vizének planktonikus baktériumközösségein egy alga tömegprodukció idején– *Hidrológiai Közlöny* 90. Évf. 6.sz. 17-19.
- BRETTAR I. – CHRISTEN R.–HÖFLE M. G. 2006: *Rheinheimera perlucida* sp. nov., a marine bacterium of the Gammaproteobacteria isolated from surface water of the central Baltic Sea –*International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56, 2177–2183.
- CAVAZOS F. P.–NICHOLSON W. 2006: *Bacillus* endospores isolated from granite: close molecular relationship to globally distributed *Bacillus* spp. from endolithic and extreme environments. – *Applied and Environmental Microbiology* 72 (4) 2856-2863.
- CHOI D. H. –ZHANG G. I.–NOH J. H.–KIM W. S.–CHO B.C.2009: *Gracilimonas tropica* gen. nov., sp. nov., isolated from a *Synechococcus* culture –*International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59, 1167–1172.
- DOBRITSA A. P.–REDDY M. C. S.– SAMADPOUR M. 2010: Reclassification of *Herbaspirillum putei* as a later heterotypic synonym of *Herbaspirillum huttiense*, with the description of *H. huttiense* subsp. *huttiense* subsp. nov. and *H. huttiense* subsp. *putei* subsp. nov., comb. nov., and description of *Herbaspirillum aquaticum* sp. nov. – *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60, 1418–1426.
- DUCKWORTH A.W. – GRANT W. D. –JONES–B. E. – VAN STEENBERG R. 1996: Phylogenic diversity of soda lake alkaliphiles. –*FEMS. Microbiology Ecology* 19: 181-19.
- FELFÖLDI T. – SOMOGYI B. –MÁRIALIGETI K.–VÖRÖS L. 2008: Duna-Tisza közti szikes tavak pikoplanktonjának molekuláris biológiai jellemzése. – *Hidrológiai Közlöny* 88.Évf. 6. sz. 55-58.
- GOMILA M.– BOWIEN B. –FALSEN E.– MOORE E. R. B.– LALUCAT J. 2007: Description of *Pelomonas aquatica* sp. nov. and *Pelomonas puraquae* sp. nov., isolated from industrial and haemodialysis water –*International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57, 2629–2635.
- GRANT S.–GRANT W. D.–JONES B. E. –KATO C., LI, L. 1999: Novel archaeal phylotypes from an East African alkaline saltern. – *Extremophiles* 3: 139–45.
- GRANT W. D. 1992: Alkaline Environments. In: Lederberg, J. (ed.) *Encyclopedia of Microbiology*. – *Academic Press*, New York. pp. 73–80.
- HORIKOSHI K. –ANTRANIKIAN G. –BULL A. T. –ROBB F. T. –STETTER K. O. 2011: *Extremophiles handbook* – *Springer*, pp. 260-281.

- JONES B. E.—GRANT W. D.—DUCKWORTH A. W.—OWENSON G. G. 1998: Microbial diversity of soda lakes. — *Extremophiles*. 2: 191–200.
- KHMELENINA N. V.—KALYUZHNYAYA M. G.—STAROSTINA N. G.—SUZINA N. E.—TROTSSENKO Y. A. 1997: Isolation and characterisation of halotolerant alcaliphilic metanotrophic bacteria from Tuva Soda Lakes. — *Current Microbiology* 35: 257–261
- KIM O. S. — CHO Y. J. — LEE K. — YOON S. H. — KIM M. — NA H. — PARK— S. C. — JEON Y. S. — LEE J. H. — YI H. — WON, S., CHUN, J. 2012: Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. — *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62: 716-721.
- KNÁB M. — SZILI-KOVÁCS T. — KISS K. — PALATINSZKY M. — MÁRIALIGETI K. — MÓGA J. — BORSODI A. 2012: Comparison of soil microbial communities from two distinct karts areas in Hungary— *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 59 (1), pp. 91-105.
- LI. W.J.— ZHANG Y. G.—TANG S. K.—XU P.—XU L. H.—JIANG C. L. 2005: *Streptomyces sodiiphilus* sp. nov., a novel alkaliphilic actinomycete — *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55, 1329–1333.
- LYNCH J. M. — BENEDETTI A. — INSAM H. — NUTI M. P. — SMALLA K. — TORSVIK V. — NANNIPIERI P. 2004: Microbial diversity in soil: ecological theories, the contribution of molecular techniques and the impact of transgenic plants and transgenic microorganisms. — *Biology and Fertility of Soils* 40: 363:385
- MANAIA C.M. — NOGALES B. — WEISS N. — NUNES O.C. 2004: *Gulosibacter molinativorax* gen. nov., sp. nov., a molinate-degrading bacterium, and classification of ‘*Brevibacterium helvolum*’ DSM 20419 as *Pseudoclavibacter helvolus* gen. nov., sp. nov. — *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54, 783–789.
- NICOLAOU G. — PIETRA R. — SABBIONI E. 1989: Trace element analysis in environmental and occupational health: Box Plot representation of elemental composition results. — *The Science of the Total Environment*, 80 167-174.
- NIELSEN P.—FRITZE D. —PRIEST G. F. 1995: Phenetic diversity of alkaliphilic *Bacillus* strains: proposal for nine new species. — *Microbiology*. 141. 1745–1761.
- OREN A. 2008. Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity— *Advances in Applied Microbiology*, 28, 56-63.
- PARK Y. D. — LEE H. B. — YI H. KIM Y. BAE K. S— CHOI J. E. — JUNG H. S. — CHUN J. 2005: *Pseudomonas panacis* sp. nov., isolated from the surface of rusty roots of Korean ginseng — *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55, 1721–1724.

- POLLÁK B. –RUSZNYÁK A. –PALATINSZKY M. –MÁRIALIGETI K. –BORSODI A. 2006: Tiszántúli szikes tavak baktériumközösségeinek összehasonlító vizsgálata– *Hidrológiai Közlöny* 86.évf. 6. sz. 88-90.
- RIVAS R. –TRUJILLO M. E. –MATEOS P. F.–MARTÍNEZ–MOLINA E.–VELAZQUEZ E. 2004: *Agromyces ulmi* sp. nov., a xylanolytic bacterium isolated from *Ulmus nigra* in Spain –*International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54, 1987–1990.
- ROMANO I. –LAMA L.–NICOLAUS B. – GAMBACORTA A.–GIORDANO A. 2005: *Bacillus saliphilus* sp. nov., isolated from a mineral pool in Campania, Italy.–*International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55, 159–163.
- SOROKIN D. Y. –LYSENKO A. M. –MITYUSHINA L. L. –TOUROVA T. P. –JONES B. E.–RAINEY F. A.–ROBERTSON L. A.–KUENEN G. J. 2003: *Thioalkalimicrobium aerophilum* gen. nov., sp. nov. and *Thioalkalimicrobium sibericum* sp. nov., and *Thioalkalivibrio versutus* gen. nov., sp. nov., *Thioalkalivibrio nitratis* sp. nov. and *Thioalkalivibrio denitrificans* sp. nov., novel obligately alkaliphilic and obligately chemolithoautotrophic sulfur–oxidizing bacteria from soda lakes. – *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53: 1779–1783.
- SOROKIN D.Y. –TOUROVA T. P.–LYSENKO A. M. –MITYUSHINA L. L.–KUENEN J. G. 2000: *Thioalkalivibrio thiocyanoxidans* sp. nov. and *Thioalkalivibrio paradoxus* sp. nov., novel alkaliphilic, obligately autotrophic, sulfur–oxidizing bacteria capable of growth on thiocyanate, from soda lakes. – *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50: 2157–2163.
- SOROKIN Y. D. –VAN PELT S. –TOUROVA T. P. –EVTUSHENKO L. I. 2009: *Nitriliruptor alkaliphilus* gen. nov., sp. nov., a deep-lineage haloalkaliphilic actinobacterium from soda lakes capable of growth on aliphatic nitriles, and proposal of Nitriliruptoraceae fam. nov. and Nitriliruptorales ord. nov. – *International Journal of Systematic Bacteriology*. 59 (2) 248-253.
- SPANKA R.– FRITZE D. 1993: *Bacillus cohnii* sp. nov., a New, Obligately Alkaliphilic, Oval–Spore–Forming *Bacillus* Species with Ornithine and Aspartic Acid Instead of Diaminopimelic Acid in the Cell Wall.– *Internal Journal of Systematic Bacteriology*. P. 150–156.
- STACKEBRANDT E.– KOCH C. –GVOZDIK O.–SCHUMANN P. 1995: Taxonomic Dissection of the Genus *Micrococcus*: *Kocuria* gen. nov., *Nesterenkonia* gen. nov., *Kytococcus* gen. nov., *Dermacoccus* gen. nov., and *Micrococcus* Cohn 1872 gen. emend. – *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* Oct. p. 682-692.

- SZABÓ G. – BORSODI A. –VLADÁR P. –CECH G. –TÓTH E. –BOROS E. –MÁRIALIGETI K. 2004: A Kiskunsági Nemzeti Park szikes tavainak bakteriológiai vizsgálata– *Hidrológiai Közlöny* 84. Évf.147-150.
- VENTOSA A. – NIETO J. J. – OREN A. 1998. Biology of moderately halophilic aerobic Bacteria– *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 504-544.
- VENTURA M. –CANCHAYA C.–TAUCH A.–CHANDRA C.–FITZGERALD G. F.–CHATER K. F.–SINDEREN D. 2007: Genomics of *Actinobacteria*: Tracing the Evolutionary History of an Ancient Phylum. –*Microbiology* 3, 495-548.
- WILLIAMS K. P. –GILLESPIE J.J. –SOBRAL B. W. S.–NORDBERG E. K.–SYNDER E. E. SHALLOM J. M.–DICKERMAN A. W. 2010: Phylogeny of Gammaproteobacteria –*Bacteriology* 192 (9): 2305–2314.
- ZHANG Y. Q. – SCHUMANN P.– LI W. J. –CHEN G. Z.– TIAN X. P.–STACKEBRANDT E.– XU LI. H.–JIANG C. L. 2005: *Isoptericola halotolerans* sp. nov., a novel actinobacterium isolated from saline soil from Qinghai Province, north–west China– *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55, 1867–1870.
- ZHAO G. Z.– LI J. –QIN S.–ZHANG Y. Q.–ZHU W. Y.– JIANG C. L.–XU L. H.–LI W. J.2009: *Micrococcus yunnanensis* sp. nov., a novel actinobacterium isolated from surface-sterilized *Polyspora axillaris* roots–*International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59, 2383–2387.
- ZWICK M. E.–JOSEPH S. J. –DIDELLOT X.–CHEN P. E.–KIMBERLY A.–BISHOP L.–STEWART A.C.–WILLNER K.–NOLAN N.–LENTZ S.–THOMASON M. K.–SOZHAMANNAN S.–MATECZUN A. J.–DU L.–READ T.D. 2012: Genomic characterization of the *Bacillus cereus* sensu lato species: Backdrop to the evolution of *Bacillus anthracis*. –*Genome Research* 22, 1512-1524.

## 8. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani

**Dr. Borsodi Andreának**, témavezetőmnek a munkában nyújtott temérdek segítségével,

**Dr. Márialigeti Károly** tanszékvezető úrnak, amiért a témával az ELTE Mikrobiológia Tanszékén foglalkozhattam,

**Krett Gergelynek** és **Szirányi Barbarának**, a labormunkálatok során nyújtott segítségükért és hasznos tanácsaikért.

Jelen kutatást az Országos Tudományos Kutatási Alapprogramok (OTKA K 108572) pályázat anyagi támogatásával végeztem.